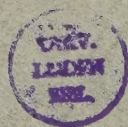


Untersuchungen zur Reaktion
von Bilirubin mit Fast Red TR
und verwandten Diazoniumsalzen

Renate Theresia Hiefinger

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Chemie am Städtischen
Krankenhaus München-Harlaching
Vorstand: Prof. Dr. L. Weiss

Untersuchungen zur Reaktion von Bilirubin mit
Fast Red TR und verwandten Diazoniumsalzen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Renate Theresia Hiefinger

aus
Julbach

Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. L. Weiss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. K. Jacob
Prof. Dr. A. Baethmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. G.E. Hoffmann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 12. 1987

Meinen Eltern gewidmet

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

dl	Deziliter
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
l	Liter
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol
N	normal
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
sec	Sekunde
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VF	Verdünnungsfaktor

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1	Material	5
2.1.1	Reagenzien	5
2.1.2	Probenmaterialien	7
2.1.3	Geräte	8
2.2	Methoden	9
2.2.1	Erstellung von Absorptionsspektren	9
2.2.2	Manuelle Methoden zur Bilirubinbestimmung nach Jendrassik und Grof (21)	10
2.2.2.1	Bilistrat ^R -Test nach Jendrassik und Grof	10
2.2.2.2	Bilirubina frazionata ^R -Test nach Jendrassik und Grof	12
2.2.3	Automatisierte Methoden zur Bilirubinbestimmung	14
2.2.3.1	DPD ^R -Methode zur Bestimmung des Gesamtbilirubins nach Wahlefeld et al. (44)	14
2.2.3.2	Bilirubinbestimmung am Analysengerät aca ^R nach Van den Bergh (42)	15
2.2.3.3	Bestimmung des Neonatalbilirubins am Analysengerät aca ^R nach Hertz et al. (15)	16
2.2.4	Eigene Testversion zur Bestimmung von Bilirubin mit Diazoniumsalzen	17
3.	Ergebnisse	18
3.1	Spektrale Eigenschaften verschiedener Azobilirubinverbindungen	18

3.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen	22
3.2.1	pH-Wert	22
3.2.2	Temperatur	24
3.2.3	Konzentration der Reaktionspartner	26
3.2.3.1	Bilirubinkonzentration	26
3.2.3.2	Diazoniumsalzkonzentration	27
3.2.4	Reaktionsvermittler	28
3.3	Stabilität der Diazoniumsalze und Azo- bilirubinverbindungen	30
3.4	Störeinflüsse	33
3.4.1	Einfluß unterschiedlichen Serumeinsatzes	33
3.4.2	Einfluß von Serumalbumin	34
3.4.2.1	Unterschiedliche Serumalbuminkonzentration	34
3.4.2.2	Absorptionsverhalten des Fast Red TR / Serumalbumin-Gemisches	36
3.4.3	Einfluß von Trübungen	37
3.4.3.1	Trübungen bei unterschiedlicher mechani- scher Handhabung	37
3.4.3.2	Darstellung der trübenden Partikel	39
3.4.4	Einfluß von Hämolyse	40
3.5	Überprüfung verschiedener Testversionen zur Bestimmung des direktreagierenden Bilirubins mit Fast Red TR	42
3.5.1	Endpunktbestimmung mit Probenleerwert	42
3.5.1.1	Ermittlung des molaren Extinktionskoeffi- zienten	42
3.5.1.2	Vergleich der mit Fast Red TR bestimmten Bilirubinwerte mit den Meßwerten des Bi- listrat ^R -Tests	43
3.5.1.3	Überprüfung der Linearität für den Fast Red TR-Test	45
3.5.2	Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart	46

3.5.3	Bestimmung mit 2-Punkt-Kinetik am Zentrifugalanalysator Centrifichem ^R	47
3.5.4	Endpunktbestimmung am Selektivanalysator RA 1000 ^R	49
3.5.5	Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart am Batchanalysator ACP 5040 ^R	51
3.5.6	Kinetische Bestimmung am Batchanalysator ACP 5040 ^R	52
3.6	Überprüfung verschiedener Testversionen zur Bestimmung des Gesamtbilirubins mit Fast Red TR	54
3.6.1	Endpunktbestimmung mit Probenleerwert	54
3.6.1.1	Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten	54
3.6.1.2	Vergleich der mit Fast Red TR bestimmten Bilirubinwerte mit den Meßwerten des Bilistrat ^R -Tests	55
3.6.1.3	Überprüfung der Linearität für den Fast Red TR-Test	57
3.6.2	Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart	58
3.6.3	Endpunktbestimmung am Selektivanalysator RA 1000 ^R	59
3.6.4	Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart am Batchanalysator ACP 5040 ^R	61
3.6.5	Kinetische Bestimmung am Batchanalysator ACP 5040 ^R	63
3.7	Vergleichsuntersuchungen zur Bestimmung des Gesamtbilirubins mit Fast Violet B	65
3.7.1	Endpunktbestimmung mit Probenleerwert	65
3.7.1.1	Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten	65
3.7.1.2	Vergleich der mit Fast Violet B bestimmten Bilirubinwerte mit den Meßwerten des Analysengerätes aca ^R	66



3.7.2	Endpunktbestimmung am Selektivanalysator RA 1000 ^R	67
3.8	Überprüfung der Fast Red TR-Tests durch Bilirubinbestimmung in Gallenflüssigkeit	69
4.	Diskussion	70
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literaturverzeichnis	87
7.	Danksagung	92
8.	Lebenslauf	93

1. Einleitung

Beim Abbau von Hämoglobin geht das Eisen des Häms in den "Eisen-Pool" ein und die Aminosäuren des Proteinanteils werden in den Intermediärstoffwechsel eingeschleust. Nur das Porphyringerüst kann nicht weiterverwendet werden. Die Hauptmenge davon wird in den reticuloendothelialen Zellen der Leber, der Milz und des Knochenmarks zu Bilirubin (Abbildung 1) abgebaut.

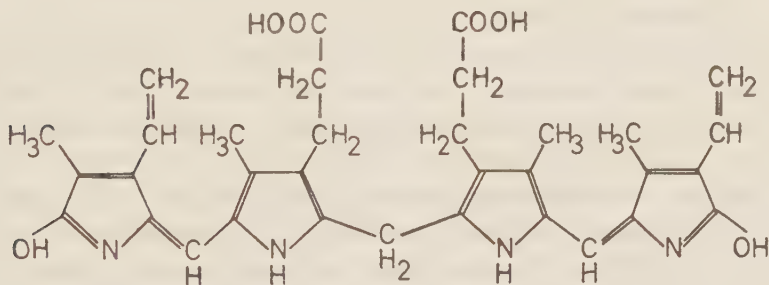


Abb. 1 : Bilirubin.

Wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit ist fast sämtliches Bilirubin im Plasma an Albumin gebunden. Dieses unlösliche Bilirubin wird als "indirektes" Bilirubin bezeichnet. Nach Fleischner und Arias (13) wird das albumingebundene Bilirubin durch ein spezifisches Transportsystem aus der Blutbahn in die Leberparenchymzellen aufgenommen. In den Mikrosomen der Leberzelle wird das Bilirubin durch die Uridyl-Glucuronyl-Transferase mit Glucuronsäure zu Bilirubinmono- und -diglucuronid konjugiert. Das glucuronidierte Bilirubin wird als "direktes" Bilirubin bezeichnet. Dieses wasserlösliche Bilirubin wird durch die Leberzelle in die Gallenkapillare abgegeben. Beim gesunden Organismus wird das Bilirubin mit der Gallenflüssigkeit in den Darm ausgeschieden.

Bei verschiedenen Erkrankungen ist dieser Mechanismus jedoch gestört (22).

So kann zum Beispiel bei vermehrtem Hämoglobinzerfall das Glucuronidierungssystem der Leber überlastet werden, so daß sich das Verhältnis von direktreagierendem Bilirubin zu indirektem Bilirubin ändert.

Bei Neugeborenen ist die Glucuronidierungskapazität der Leber noch unterentwickelt; dies führt ebenfalls zu Verschiebungen im Verhältnis zwischen direktem und indirektem Bilirubin.

Bei Leberzellschädigungen, Störungen des Ausflusses in die Gallenkapillare oder bei Gallengangsverschlüssen ist die Bilirubinausscheidung über die Gallenflüssigkeit vermindert oder völlig blockiert. Dies führt zu erhöhten Bilirubinkonzentrationen im Blut. Dabei kann sowohl die absolute Bilirubinkonzentration als auch das Verhältnis von direktem zu indirektem Bilirubin beeinflußt werden (7). Erhöhtes direktreagierendes Bilirubin wird über die Niere ausgeschieden.

Aus der Messung von gesamtem und direktreagierendem Bilirubin lassen sich somit wichtige diagnostische Schlüsse auf Art und Lokalisation verschiedener Erkrankungen des Leber-Gallen-Darm-Traktes ziehen (36). Die Bilirubinbestimmung hat daher in der medizinischen Diagnostik eine besondere Bedeutung erlangt.

Die am häufigsten ausgeführten Bilirubin-Nachweisreaktionen beruhen auf der Kupplung des Bilirubins mit Diazoniumsalzen.

1883 wies Ehrlich (9) als erster darauf hin, daß Urinbilirubin mit diazotierter Sulfanilsäure gekoppelt werden kann und die entstehenden Azopigmente bei neutralem pH-Wert rot, bei stark saurem bzw. stark

alkalischem pH-Wert blau gefärbt sind.

Van den Bergh und Snapper (42) verwendeten dieses Prinzip erstmals 1913 zur Bestimmung des Serumbilirubins. Sie beobachteten dabei neben einer direktreagierenden Fraktion noch wechselnde Mengen von Bilirubin, die erst nach Vorbehandlung des Serums mit Alkohol mit der diazotierten Sulfanilsäure reagierten und bezeichneten dieses als "indirektes" Bilirubin. Da bei dieser Methode die Bilirubinbestimmung erst nach Enteiweißung des Serums erfolgte, bei der Präzipitation jedoch unterschiedliche Mengen des albumingebundenen Bilirubins mitgefällt wurden, war die Ausbeute dieses Tests unbefriedigend.

Malloy und Evelyn (27) verwendeten zur Freisetzung des albumingebundenen Bilirubins Methanol, bei der Bestimmung nach Jendrassik und Cleghorn (20) wird das Bilirubin durch Anionen wie Natriumacetat, Natriumbenzoat und Coffein aus seiner Eiweißbindung verdrängt.

Die am häufigsten verwendete differenzierte Bestimmung von gesamtem und direktreagierendem Bilirubin nach Jendrassik und Grof (21) zeichnet sich durch geringe Reagenzienstabilität und umständliche Durchführung aus.

Bei den neueren Verfahren nach Rand und Di Pasqua (34), Winsten und Cehelyk (47), Wahlefeld et al. (44) und Colombo et al. (5,6) wurde die diazotierte Sulfanilsäure durch stabilere Diazoniumsalze und das Coffein durch Detergenzien ersetzt. Es ergaben sich hier jedoch Probleme bei der selektiven Erfassung des sogenannten "direkten" Bilirubins, da meist eine Mitreaktion des indirekten Anteils zu beobachten war (30,33).

Hoffmann und Weiss (17) beobachteten 1983 eine durch Bilirubin hervorgerufene Störung bei der Bestimmung der sauren Phosphatase mit Fast Red TR nach Hillmann (16).

Ausgehend von dieser Beobachtung sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden unter welchen allgemeinen Bedingungen Bilirubin mit verschiedenen stabilen Diazoniumsalzen reagiert.

Darüberhinaus sollte geprüft werden inwieweit sich die Reaktion von Serumbilirubin mit stabilen Diazoniumsalzen für die Bestimmung von direktreagierendem und gesamtem Bilirubin im Serum nützen läßt.

Ferner sollte versucht werden diese Methoden zur Bilirubinbestimmung mit stabilen Diazoniumsalzen auf übliche Analysengeräte des klinisch-chemischen Labors zu adaptieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Folgende kommerziell erhältliche Testpackungen wurden verwendet:

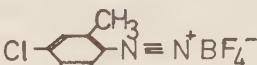
DPD^R-Testpackung / Boehringer Mannheim

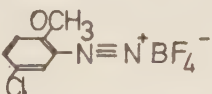
aca^R Analytical Testpacks C-BIL, T-BIL, N-BIL /
Dupont Genf

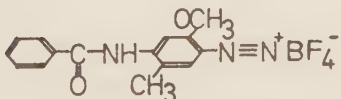
Bilistrat^R-Testpackung / Gödecke Freiburg

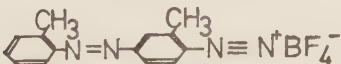
Bilirubina frazionata^R-Testpackung / Chemi lab Milano

Diazoniumsalze zur Bilirubinbestimmung/ Sigma St.Louis:

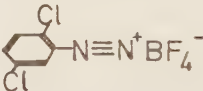
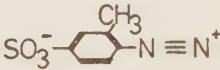
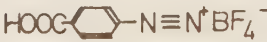
Fast Red TR		MG 240
-------------	---	--------

Fast Red RC		MG 256
-------------	--	--------

Fast Violet B		MG 355
---------------	---	--------

Fast Garnet GBC		MG 324
-----------------	---	--------

Freundlicherweise wurden folgende Diazoniumsalze für die Bilirubinbestimmung von der Fa. Boehringer Mannheim synthetisiert und zur Verfügung gestellt:

BM 31.094		MG 261
BM 31.612		MG 184
BM 31.613		MG 198
BM 31.614		MG 236
BM 31.615		MG 250

Humanserumalbumin / Behringwerke Marburg

Alle übrigen Chemikalien waren analysenreine Substanzen (p.a.) der Fa. Merck Darmstadt.

2.1.2 Probenmaterialien

Frisch entnommenes Vollblut von Erwachsenen und Neugeborenen wurde 10 min bei 1500 G zentrifugiert. Das abgetrennte Serum wurde kühl und lichtgeschützt aufbewahrt und innerhalb 1 - 5 Stunden nach Entnahme analysiert.

Intraoperativ gewonnene Blasengalle von Erwachsenen wurde bis zur Verwendung bei -20° Celsius aufbewahrt.

Folgende Kontrollmaterialien wurden verwendet:

Kontrollserum Großhadern^R / Boehringer Mannheim

Kontrollserum Precipath^R U / Boehringer Mannheim

Kontrollserum Decision^R Level II / Beckmann München

Kontrollserum Bilistandard^R / Dupont Genf

2.1.3 Geräte

Reaktionsgefäße 72.690 / Sarstedt Ulm

Analysenwaage / Mettler Zürich

Digital-pH-Meter Modell 3500 / Beckmann München

Magnetrührer / Cenco Breda

Coulter Counter S Plus / Coulter Electronics Krefeld

Centrifichem System 400 / Vogel Giessen

RA 1000 Mehrkanalgerät / Technicon Bad Vilbel

aca Analyzer / Dupont Genf

Spektralphotometer DU 7 mit DOT Matrix Printer Model
PX 80 / Beckman München

Mikroliterpipetten, K-Küvetten 4071/1, Tischzentrifuge
5413, Thermostat 2761, Thermomixer 5433, Photometer
1101 M mit Küvettenwechselausomat 2705 und Kompensa-
tionsschreiber 6512, Photometer PCP 6121 mit Drucker
6524 und Absaugpumpe 4151, Kinetikautomat ACP 5040 mit
F-Diluter und F-Dispenser 5208 / Eppendorf Hamburg.

2.2 Methoden

2.2.1 Erstellung von Absorptionsspektren

Folgende Absorptionsspektren wurden auf dem Spektralphotometer DU 7 (Beckman) aufgenommen:

a) Eigenextinktion des Serums:

0.04 ml Humanserum bestimmter Bilirubinkonzentration wurde mit 1.0 ml Tris/Citrat-Puffer pH 5.2 gemischt

b) Eigenextinktion der Diazoniumsalzlösung

c) Extinktion der entstandenen Azobilirubinverbindungen:

0.04 ml Humanserum bestimmter Bilirubinkonzentration wurde mit 1.0 ml Diazoniumsalzlösung gemischt und 10 min bei 25°C inkubiert.

Gemessen wurde gegen Tris/Citrat-Puffer im Bereich von 250 nm bis 750 nm bei 1 cm Schichtdicke und Raumtemperatur in Quarzküvetten.

2.2.2 Manuelle Methoden zur Bilirubinbestimmung nach Jendrassik und Grof (21)

2.2.2.1 Bilistrat^R-Test nach Jendrassik und Grof

Bilirubin wurde an diazotierte Sulfanilsäure gekoppelt. Um das Absorptionsmaximum des entstandenen Azofarbstoffes in den langwelligen Bereich zu verschieben, wurde das Reaktionsgemisch mit Fehling-II-Lösung alkalisiert.

Zur Bestimmung des Gesamtbilirubins wurde das an Albumin gebundene Bilirubin durch Coffeinelösung freigesetzt und für die Diazotierung verfügbar.

Bei der Bestimmung des direktreagierenden Bilirubins mußte die überschüssige diazotierte Sulfanilsäure mit Hydroxylamin-Hydrochlorid zerstört werden, um eine Diazotierung des noch nicht umgesetzten indirekten Bilirubins zu verhindern.

Verwendete Reagenzien:

- Lösung 1 : Sulfanilsäure
- Lösung 2 : Nitrit
- Lösung 3 : Coffein-Reagenz
- Lösung 4 : Farbentwickler (Fehling-II-Lösung)
- Lösung 5 : Hydroxylamin-Hydrochlorid

Mikroansatz mit vorgemischten Reagenzien:

- Gemisch 6 : 1.0 ml Sulfanilsäure + 1.0 ml Coffein
Reagenz
- Gemisch 7 : 1.0 ml Sulfanilsäure + 0.05 ml Nitrit +
1.0 ml Coffein-Reagenz
- Gemisch 8 : 1.0 ml Sulfanilsäure + 0.05 ml Nitrit

Gesamtbilirubin		Direktreag. Bilirubin	
	Leerwert	Hauptwert	
Probe	20 µl	20 µl	20 µl
Gemisch 6	200 µl	---	---
Gemisch 7	---	200 µl	---
Lösung 1	---	---	100 µl
Gemisch 8	---	---	100 µl

rütteln; * nach genau 5 min (Stoppuhr)

Lösung 5	---	---	*100 µl	*100 µl
Lösung 4	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

rütteln und 30 -40 min bei 25°C inkubieren;

anschließend bei 578 nm und 1 cm Schichtdicke in der
Mikroküvette gegen den Leerwert messen.

$$c = OD \times 13.9 \text{ (mg/dl)}$$

Endkonzentrationen im Test:

- diazotierte Sulfanilsäure : 0.027 mol/l
- Coffein-Reagenz : 0.305 mol/l
- Fehling-II-Lösung : 1.303 mol/l.

2.2.2.2 Bilirubina frazionata^R-Test nach Jendrassik und Gröf

Bilirubin wurde an diazotierte Sulfanilsäure gekoppelt. Das so entstandene Azobilirubin war in saurer Lösung rot gefärbt.

Für die Bestimmung des Gesamtbilirubins wurde das an Albumin gebundene Bilirubin durch DMSO-Lösung freigesetzt und für die Diazotierung verfügbar.

Bei der Bestimmung des direktreagierenden Bilirubins wurde die überschüssige diazotierte Sulfanilsäure mit Natriumazid zerstört, um eine Diazotierung von noch nicht umgesetztem indirekten Bilirubin zu verhindern.

Verwendete Reagenzien:

- | | |
|----------------------------|------------|
| - Lösung A : Sulfanilsäure | 29 mmol/l |
| DMSO | 148 mmol/l |
| - Lösung B : Sulfanilsäure | 29 mmol/l |
| - Lösung C : Natriumnitrit | 72 mmol/l |
| - Lösung D : Natriumazid | 3.1 mmol/l |

	Leerwert	Gesamtbilirubin	Dir. Bilirubin
Lösung A	2.0 ml	2.0 ml	---
Lösung B	---	---	2.0 ml
Lösung C	---	0.05 ml	0.05 ml
Probe	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml

rütteln; nach genau 5 min zugeben:

Lösung D	---	---	0.05 ml
----------	-----	-----	---------

rütteln und mindestens 15 min bei 25°C inkubieren;
anschließend bei 548 nm und 1 cm Schichtdicke in Ein-
malküvetten gegen den Leerwert messen.

$$c = OD \times 12.8 \text{ (mg/dl)}.$$

2.2.3.2 Bilirubinbestimmung am Analysengerät aca^R nach Van den Bergh (42)

Bilirubin wurde mit p-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (PNB) zu dem entsprechenden Azobilirubin gekoppelt.

Das unkonjugierte Bilirubin wurde für die Bestimmung des Gesamtbilirubins durch Tween 20^R freigesetzt und somit für die Diazotierung verfügbar. Das Detergenz enthielt einen Hemmstoff des Bakterienwachstums.

Die durch die Bildung von Azobilirubin bedingte Extinktionsänderung wurde mit Hilfe einer Zwei-Filter-Endpunktmethode gemessen.

Verwendete Reagenzien:

Gesamtbilirubin	Direktreag. Bilirubin

Zelle 1 : Tween 20 ^R	---
Zelle 2 : PNB 15 µmol	---
Zelle 3 : 50 µl H ₂ SO ₄ 4 N	50 µl H ₂ SO ₄ 4 N
Zelle 4 : Tween 20 ^R	---
Zelle 6 : ---	PNB 17 µmol

Der aca^R entnahm 60 µl Probe aus dem Probengefäß und injizierte sie zusammen mit 4.94 ml Aqua dest. in das Testpack.

Nach einer Reaktionszeit von 261.5 sec für Gesamtbilirubin bzw. 39.5 sec für direktreagierendes Bilirubin bei 37°C wurde die Extinktion nach der Zwei-Filter-Endpunktmethode bei 540 nm und 600 nm gemessen.

2.2.3.3 Bestimmung des Neonatalbilirubins am Analysengerät aca^R nach Hertz et al. (15)

Die Extinktion der Probe wurde mit zwei Filtern bei 452 nm und 540 nm gemessen. Die Differenz war direkt proportional zur Bilirubinkonzentration.

Die Extinktion bei 452 nm ist sowohl auf Bilirubin als auch auf eventuell vorhandenes Hämoglobin zurückzuführen. Da Bilirubin bei 540 nm nicht absorbiert, Hämoglobin bei dieser Wellenlänge jedoch die gleiche Extinktion aufweist wie bei 452 nm, wird durch die Differenzbildung die Hämoglobin-Extinktion eliminiert.

Der aca^R entnahm 20 µl Probe aus dem Probengefäß und injizierte sie zusammen mit 4.98 ml Phosphatpuffer bei 37°C in das Testpack.

Die Extinktion wurde nach der Zwei-Filter-Methode bei 452 nm und 540 nm gemessen.

2.2.4 Eigene Testversion zur Bestimmung von Bilirubin mit Diazoniumsalzen

Prinzip:

Bilirubin reagiert mit Diazoniumsalz zum entsprechenden Azobilirubin.

Verwendete Reagenzien:

- Puffer : Citronensäure (0.2 mol/l) wird mit Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (0.2 mol/l) auf pH-Werte von 1.8 bis 9.1 eingestellt
- Reagenz: Diazoniumsalz (8 mmol/l) in Puffer gelöst

	Leerwert	Hauptwert
Reagenz	---	500 μ l
Puffer	500 μ l	---
Probe	20 μ l	20 μ l

mischen und 10 min bei 25°C inkubieren; anschließend bei 546 nm und 1 cm Schichtdicke in Mikroküvetten gegen den Probenleerwert messen.

$$c = \frac{OD \times 26}{\epsilon_{app}} \times 0.0584 \text{ (mg/dl)}$$

3. Ergebnisse

3.1 Spektrale Eigenschaften verschiedener Azobilirubinverbindungen

Die Absorptionsspektren der verschiedenen Diazoniumsalze wurden nach der in 2.2.1 dargestellten Methode aufgenommen. Der Puffer (pH 5.2) und die entsprechenden Reagenzlösungen wurden wie in 2.2.4 beschrieben hergestellt. Das verwendete Serum wies einen Gehalt an direktreagierendem Bilirubin von 3.8 mg/dl auf.

Die Abbildungen 2 a - d zeigen die Absorptionsspektren für das Serum und die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Diazoniumsalze vor bzw. nach der Reaktion mit Serumbilirubin.

Für die Diazoniumsalze BM 31.094, BM 31.613, BM 31.614, Fast Red RC, Fast Red TR und Fast Violet B waren im Bereich von 500 nm - 600 nm nach der Kupplung an Serumbilirubin höhere Extinktionswerte als vor der Reaktion zu beobachten. Für die Diazoniumsalze BM 31.612 und Fast Garnet GBC fanden sich dagegen keine Extinktionsunterschiede. Für BM 31.615 lagen die Extinktionswerte jedoch bereits vor der Zugabe von Serum größtenteils außerhalb des Meßbereiches des Gerätes.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß vom Spektrum her alle hier aufgeführten Diazoniumsalze prinzipiell zur Bilirubinbestimmung geeignet sind.

Die Ausnahme bildet Fast Garnet GBC, dessen Absorptionsverhalten durch die konjugierte Doppelbindung zwischen zwei aromatischen Ringen stark beeinflusst wird.

Die Absorptionsspektren für BM 31.615 wurden durch Instabilität des Salzes und durch schon mit dem Auge sichtbare Trübungen gestört.

Auf das überraschende Absorptionsverhalten von BM 31.612 wird in der Diskussion näher eingegangen.

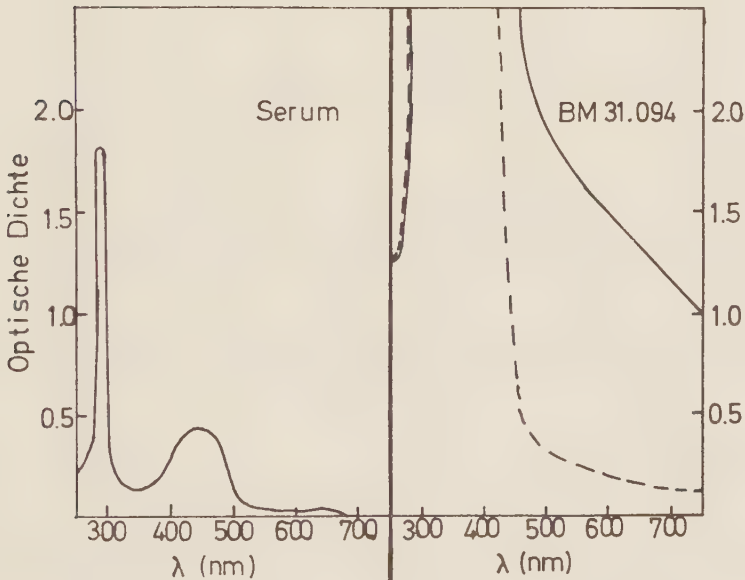


Abb. 2a: Absorptionsspektrum des verwendeten Serums.

Abb. 2b: Absorptionsspektrum des Diazoniumsalzes BM 31.094 bei pH 5.2 vor (---) bzw. 10 min nach (—) Start der Azokupplungsreaktion.

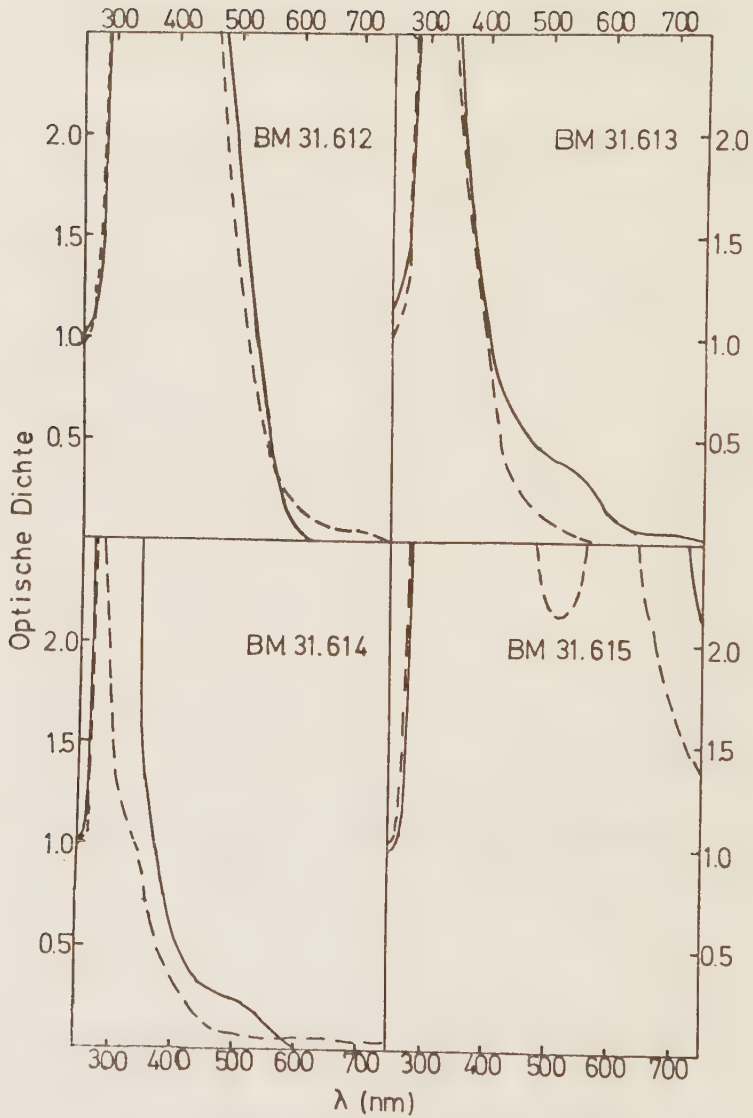


Abb. 2c : Absorptionsspektren von 4 verschiedenen Diazoniumsalzen bei pH 5.2 vor (---) bzw. 10 min nach Start der Azokupplungsreaktion (—).

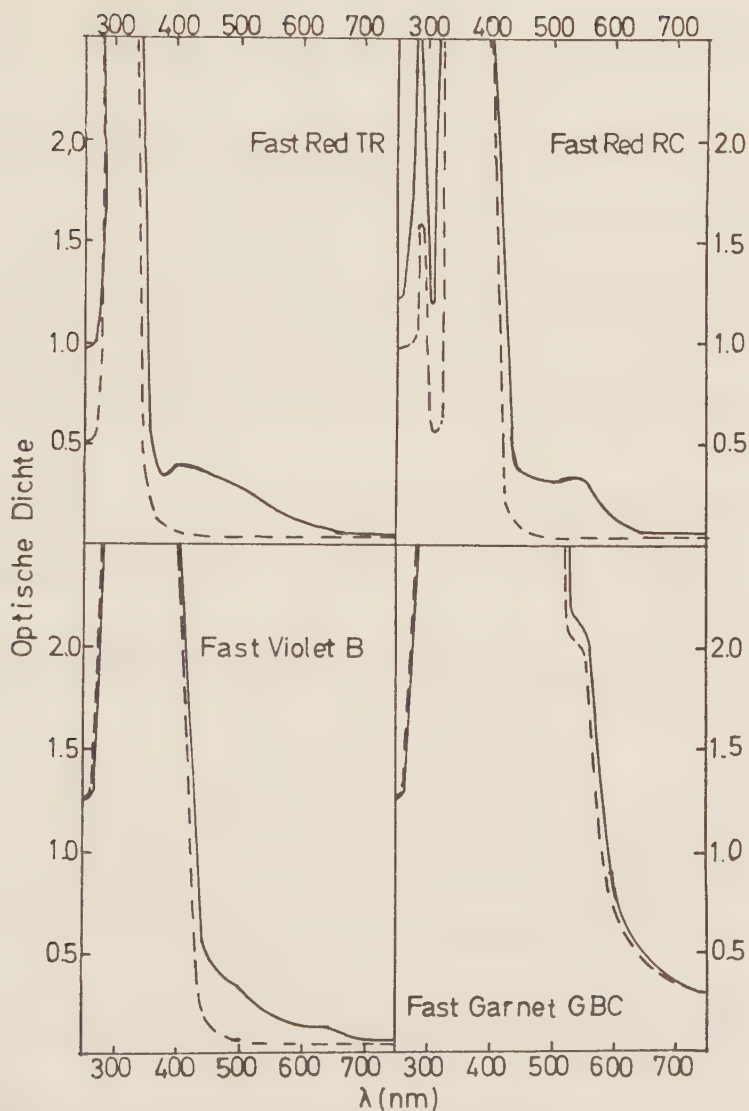


Abb. 2d : Absorptionsspektren von 4 verschiedenen Diazoniumsalzen bei pH 5.2 vor (---) bzw. 10 min nach Start der Azokupplungsreaktion (—).

3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

3.2.1 pH-Wert

Die Abbildung 3 zeigt das Reaktionsverhalten der verschiedenen Bilirubin-Diazoniumsalz-Verbindungen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Die verwendeten Puffer und die entsprechenden Reagenzlösungen wurden wie in 2.2.4 beschrieben hergestellt. Das eingesetzte Neugeborenen Serum enthielt 10.0 mg/dl Gesamtbilirubin, mit einem direkt reagierenden Anteil von weniger als 10 %.

Die Reagenzlösungen der Diazoniumsalze BM 31.094, BM 31.614 und Fast Red RC zeigten bei pH-Werten über 7.0 deutliche Instabilität und wiesen nach Serumzugabe Trübungen auf.

Die Extinktionswerte für BM 31.615 lagen bereits vor der Serumzugabe außerhalb des Meßbereichs des Photometers.

Für die Diazoniumsalze BM 31.612 und BM 31.613 war bereits bei pH-Werten um 5.0 eine Reaktion mit albumingebundenem Bilirubin zu beobachten, Fast Violet B hingegen zeigte bei 546 nm erst im alkalischen Bereich eine Extinktionszunahme.

Das Diazoniumsalz Fast Red TR reagierte erst bei pH-Werten über 6.5 und erreichte maximale Extinktionszunahmen bei pH 7.0.

Für die weiteren Untersuchungen wurde vorwiegend dieses Salz verwendet (Abschnitt 3.2.2 - 3.6.5).

Die in Abb. 3 dargestellten pH-Abhängigkeiten legen den Schluß nahe, daß zwischen Reaktivität bzw. Stabilität verschiedener Diazoniumsalze einerseits und der chemischen Struktur ihrer Substituenten andererseits enge Wechselbeziehungen bestehen (siehe Abschnitt 4).

Zusammenfassend kann bereits hier festgestellt werden, daß Verbindungen, die bei pH-Werten unter 7.0 mit Bilirubin reagieren, in wässriger Lösung kaum haltbar sind und instabile Azofarbstoffe bilden (BM 31.094, BM 31.614).

Reaktionsträgere Salze wie Fast Violet B dagegen zeichnen sich durch lange Haltbarkeit in wässriger Lösung aus.

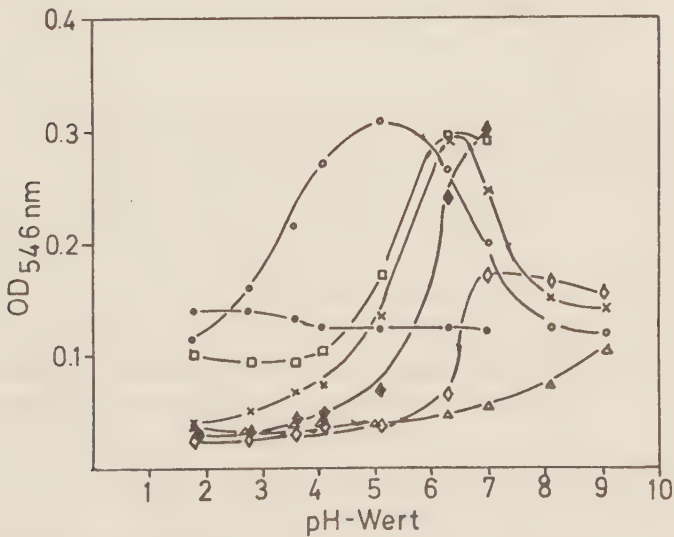


Abb. 3 : pH-Abhängigkeit der Azokupplungsreaktion verschiedener Diazoniumsalze mit Serumbilirubin (●-● BM 31.094, ○-○ BM 31.612, X-X BM 31.613, □-□ BM 31.614, ◇-◇ Fast Red TR, ◆-◆ Fast Red RC, Δ-Δ Fast Violet B).

3.2.2 Temperatur

Die Extinktionsverläufe für die Bestimmung des direkt-reagierenden und des gesamten Bilirubins bei verschiedenen Temperaturen sind in den Abbildungen 4 a und 4 b dargestellt.

Das verwendete Serum enthielt 11.6 mg/dl Gesamtbilirubin, davon 6.4 mg/dl direktreagierendes Bilirubin, gemessen nach Van den Bergh (42) mit dem aca^{R} -Analysengerät.

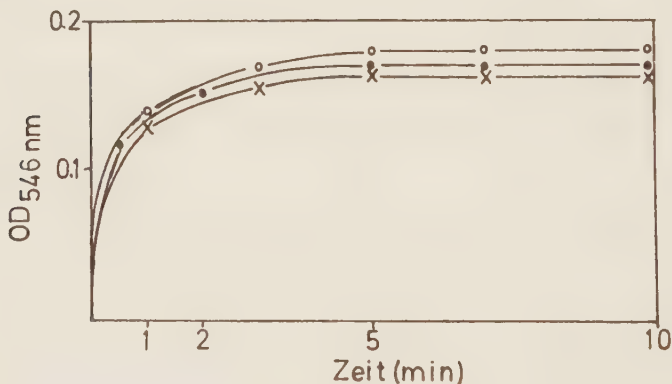


Abb. 4a : Extinktionsverlauf der Azokupplungsreaktion von Fast Red TR mit dem gesamten Serumbilirubin bei 4°C (x-x), 25°C (•-•) und 37°C (o-o).

Bei der Bestimmung des Gesamtbilirubins mit Fast Red TR bei pH 7.0 ergaben sich für die gewählten Temperaturen geringe Unterschiede in den Extinktionswerten.

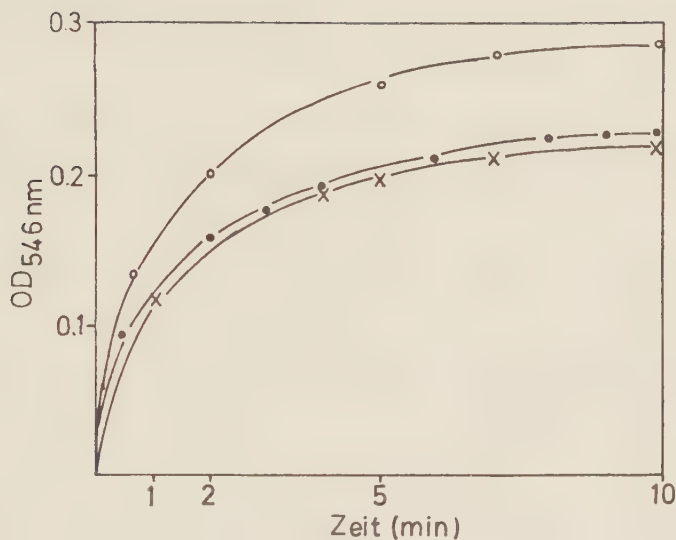


Abb. 4b : Extinktionsverlauf der Azokupplungsreaktion von Fast Red TR mit dem direkten Serumbilirubin bei 4°C (x-x), 25°C (•-•) und 37°C (o-o).

Bei der Bestimmung des direktreagierenden Bilirubins mit Fast Red TR bei pH 5.2 hingegen bedingte die Erhöhung der Inkubationstemperatur von 25°C auf 37°C eine deutliche Anhebung des Meßsignals um circa 30 %.

Daraus kann geschlossen werden, daß das Absorptionsverhalten in gewissem Maße temperaturabhängig ist. Bei den in Abschnitt 3.5 - 3.7 dargestellten Versuchen wurde deshalb für jede Temperatur neu kalibriert.

3.2.3 Konzentrationen der Reaktionspartner

3.2.3.1 Bilirubinkonzentration

In Abbildung 5 ist das Extinktionsverhalten der Azobilirubinverbindungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Bilirubinmenge dargestellt.

Das verwendete Serum enthielt 23.5 mg/dl Gesamtbilirubin, davon 16.1 mg/dl direktreagierendes Bilirubin. Die unterschiedlichen Bilirubinkonzentrationen wurden durch Verdünnung des Serums mit isotoner NaCl-Lösung (9.0 g/l) erreicht.

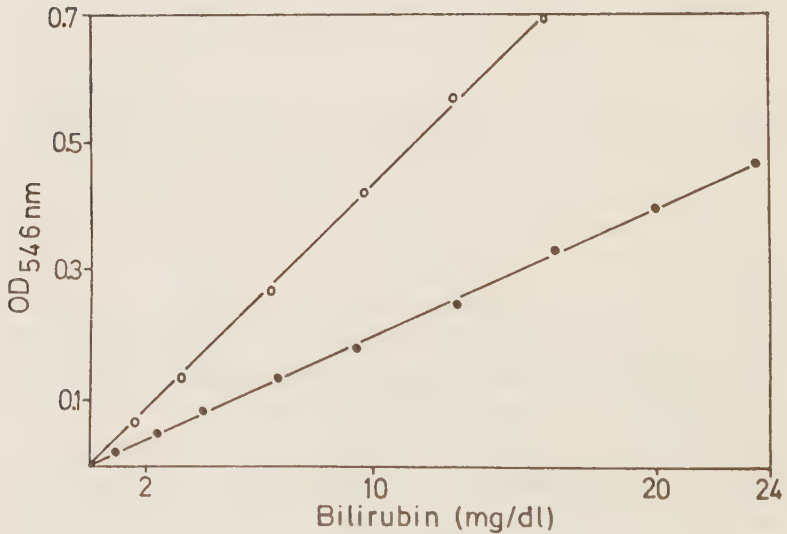


Abb. 5 : Abhängigkeit der Höhe des Meßsignals von der eingesetzten Menge an gesamtem (•-•) und direktem (o-o) Bilirubin.

Es zeigte sich bei beiden Testen eine lineare Zunahme der Extinktionswerte bis zu 23.5 mg/dl Gesamtbilirubin bzw. bis zu 16.1 mg/dl direktreagierendem Bilirubin.

Seren mit höheren Bilirubingehalten wurden nicht getestet, da sie in unserem Patientengut nicht auftraten und eine Verdünnungsgrenze oberhalb von 20 mg/dl Bilirubin ohne praktische Bedeutung wäre.

3.2.3.2 Diazoniumsalzkonzentration

Abbildung 6 zeigt das Extinktionsverhalten der Azobilirubinverbindungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Diazoniumsalzmenge.

Das verwendete Serum (a) enthielt 10.1 mg/dl Gesamtbilirubin, davon 6.5 mg/dl direktreagierendes Bilirubin. Um eine eventuelle Mitreaktion von albumingebundenem Bilirubin bei pH 5.2 zu erfassen, wurde gleichzeitig ein Neugeborenenserum (b) mit einem Gesamtbilirubingehalt von 8.9 mg/dl mitvermessen.

Die Bilirubinkonzentrationen wurden am aca^{R} nach Van den Bergh (42) bzw. Hertz et al. (15) ermittelt.

Die Steigerung der Fast Red TR-Konzentration von 2.0 mg/ml auf 5.0 mg/ml bedingte eine deutliche Zunahme des Meßsignals, unabhängig davon, ob das Serum viel (a) oder wenig (b) direktreagierendes Bilirubin enthielt.

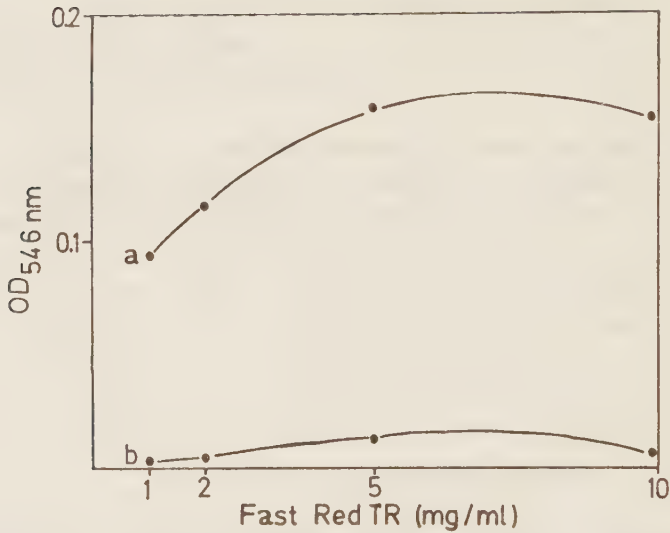


Abb. 6 : Abhängigkeit der Meßsignalhöhe von der eingesetzten Diazoniumsalzmenge in Gegenwart von viel (a) bzw. wenig (b) direktem Bilirubin.

3.2.4 Reaktionsvermittler

Der Einfluß verschiedener Reaktionsvermittler auf die Verfügbarkeit des Bilirubins für die Azokupplung wurde in folgenden Ansätzen überprüft und in Abbildung 7 dargestellt:

- a) Fast Red TR-Reagenz pH 2.0 mit Zusatz von
- | | |
|--------------------------|------|
| - 4 % Brij ^R | bzw. |
| - 12 % Brij ^R | bzw. |
| - 10 % Triton | bzw. |
| - 10 % Äthanol | |

- b) Fast Red TR-Reagenz pH 5.2 mit Zusatz von
- 0.9 mmol/l Coffein bzw.
 - 9.0 mmol/l Coffein
- c) Fast Red TR-Reagenz pH 7.0 mit Zusatz von
- 10 % DMF bzw.
 - 10 % DMSO
- d) Fast Violet B-Reagenz pH 7.2 mit Zusatz von
- 0.16 % Dioxan.

Das verwendete Serum enthielt 11.0 mg/dl Gesamtbilirubin, davon 7.3 mg/dl direktreagierendes Bilirubin.

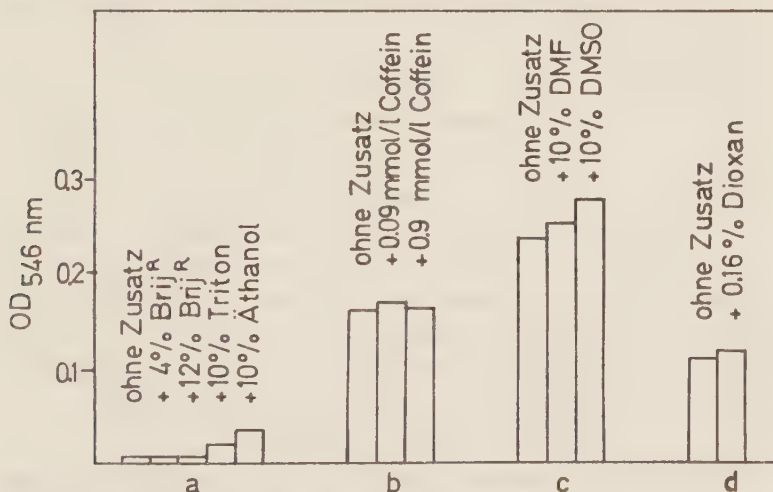


Abb. 7 : Einfluß von Reaktionsvermittlern auf die Azokupplungsreaktion von Bilirubin mit Fast Red TR bei pH 2.0 (a), pH 5.2 (b) und pH 7.0 (c) bzw. mit Fast Violet B bei pH 7.2 (d).

Der Zusatz von 10 % DMSO zu Fast Red TR-Reagenz pH 7.0 bewirkte eine Zunahme des Meßsignals um 14.5 %. Die übrigen Reaktionsvermittler bedingten nur geringe Veränderungen der Meßsignale.

3.3 Stabilität der Diazoniumsalze und Azobilirubinverbindungen

Die Diazoniumsalze wurden wie in 2.2.4 beschrieben in den entsprechenden Puffern gelöst. Zusätzlich wurden noch 0.2 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7.0, 0.2 mol/l Triäthanolamin/HCl-Puffer pH 7.2 und 0.02 mol/l Citronensäure pH 2.0 verwendet.

Die Extinktionsänderungen über die Zeit bei 4°C und 25°C sind in Abbildung 8 a dargestellt.

Es zeigte sich dabei für Fast Red TR in Tris/Citrat-Puffer pH 7.0 bei 25°C eine starke, bei 4°C bzw. in Tris/HCl-Puffer pH 7.0 bei 25°C eine geringere Extinktionszunahme.

Deutliche Ausflockungen waren bei dem in Triäthanolamin/HCL-Puffer gelösten Fast Red TR zu beobachten.

Zur Überprüfung der Stabilität verschiedener Azobilirubinverbindungen wurde ein Teil der oben aufgeführten Reagenzlösungen in das in 2.2.4 beschriebene Bestimmungsverfahren eingesetzt.

Das verwendete Serum enthielt 11.0 mg/dl Gesamtbilirubin, davon 7.3 mg/dl direktreagierendes Bilirubin.

In Abbildung 8 b sind die Extinktionsänderungen über die Zeit bei 4°C, 25°C und 37°C aufgetragen.

Für Fast Red TR in Tris/HCl-Puffer pH 7.0 war dabei eine starke, in Tris/Citrat-Puffer pH 7.0 eine geringere Abnahme der Extinktion zu beobachten.

Fast Red TR in Tris/Citrat-Puffer pH 5.2 und Fast Violet B in Tris/Citrat-Puffer pH 7.0 hingegen zeigten eine geringe Extinktionszunahme.

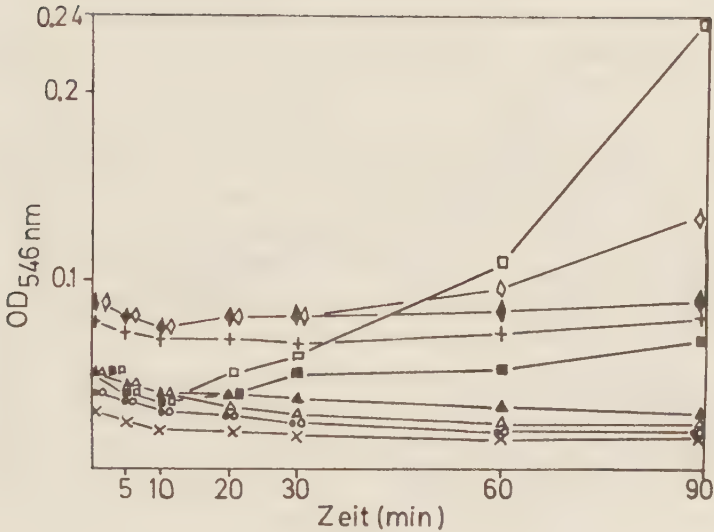


Abb. 8a : Stabilität verschiedener Diazoniumsalzlösungen über die Zeit

(- Fast Red TR gelöst in:

●-● 0.02 mol/l Citronensäure pH 2.0 / 4°C

○-○ 0.02 mol/l Citronensäure pH 2.0 / 25°C

▲-▲ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 5.2/ 4°C

△-△ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 5.2/ 25°C

■-■ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0/ 4°C

□-□ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0/ 25°C

◆-◆ 0.2 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7.0 / 4°C

◇-◇ 0.2 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7.0 / 25°C

- Fast Violet B gelöst in:

x-x 0.02 mol/l Citronensäure pH 2.0 / 25°C

+ + 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0/ 25°C).

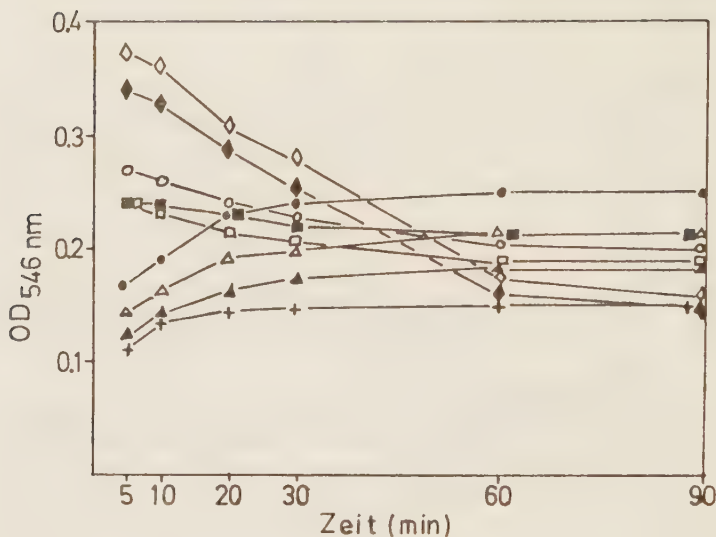


Abb. 8b : Stabilität verschiedener Azobilirubinverbindungen über die Zeit

(- Fast Red TR gelöst in:

▲-▲ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 5.2/ 4°C

△-△ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 5.2/25°C

●-● 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 5.2/37°C

■-■ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0/ 4°C

□-□ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0/25°C

○-○ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0/37°C

◆-◆ 0.2 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7.0 / 4°C

◇-◇ 0.2 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7.0 /25°C

- Fast Violet B gelöst in:

+ -+ 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0/25°C).

3.4 Störeinflüsse

3.4.1 Einfluß unterschiedlichen Serumeinsatzes

Abbildung 9 zeigt das Extinktionsverhalten der Azobilirubinverbindungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Serummenge.

Das verwendete Serum enthielt 6.3 mg/dl direkt reagierendes Bilirubin bei einem Gesamtbilirubin von 7.8 mg/dl.

Um die unterschiedlichen Serumvolumina im Ansatz zu berücksichtigen wurden die gemessenen Extinktionsänderungen mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren multipliziert.

Es zeigte sich dabei eine relative Abnahme der Extinktion mit zunehmendem Serumeinsatz.

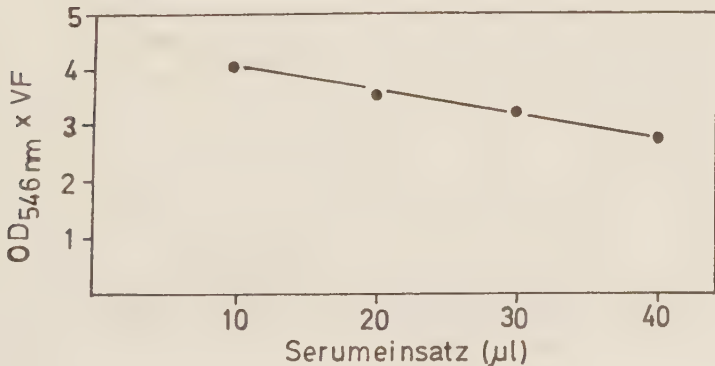


Abb. 9 : Abhängigkeit der Meßsignalhöhe von der eingesetzten Serummenge.

3.4.2 Einfluß von Serumalbumin

3.4.2.1 Unterschiedliche Serumalbuminkonzentration

- a) Serum mit einem Gehalt von 12.5 mg/dl direkt reagierendem Bilirubin und 3.2 g/dl Albumin wurde mit isotoner NaCl-Lösung (9.0 g/l) bzw. Albumin-Lösung (3.2 g/dl) verdünnt und mit Fast Red TR bei pH 5.2 vermessen.

Die Extinktionsänderungen wurden mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren multipliziert und in Abbildung 10 a aufgetragen.

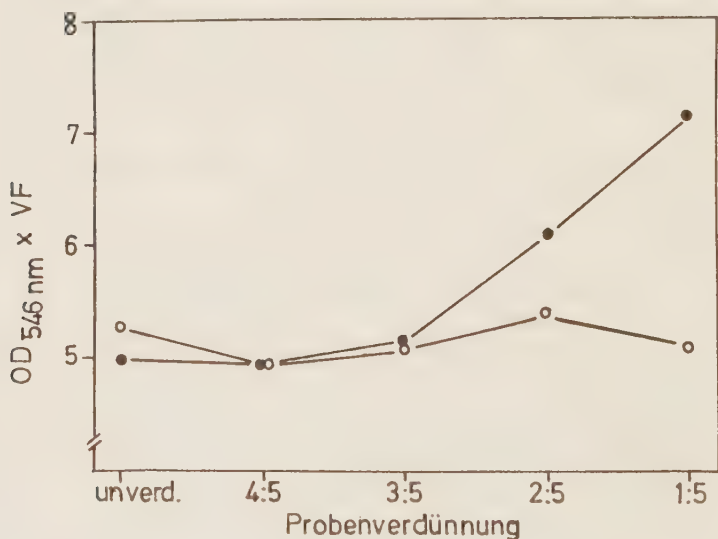


Abb. 10a : Einfluß unterschiedlicher Serumalbuminkonzentration

(Probenverdünnung mit isotoner NaCl-Lösung
●—● bzw. mit Albuminlösung (3.2 g/dl)○—○).

Das Meßsignal wurde dabei mit abnehmender Albuminkonzentration größer, blieb jedoch bei konstanter Albuminkonzentration in etwa unverändert.

- b) Serum mit 8.2 mg/dl direktreagierendem Bilirubin und 2.7 g/dl Albumin wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Albumin-Lösung (5.0 g/dl) angereichert und mit Fast Red TR bei pH 5.2 vermessen.

Es wurde wiederum das Produkt aus den Extinktionsänderungen und den jeweiligen Verdünnungsfaktoren gebildet und in Abbildung 10 b in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration dargestellt.

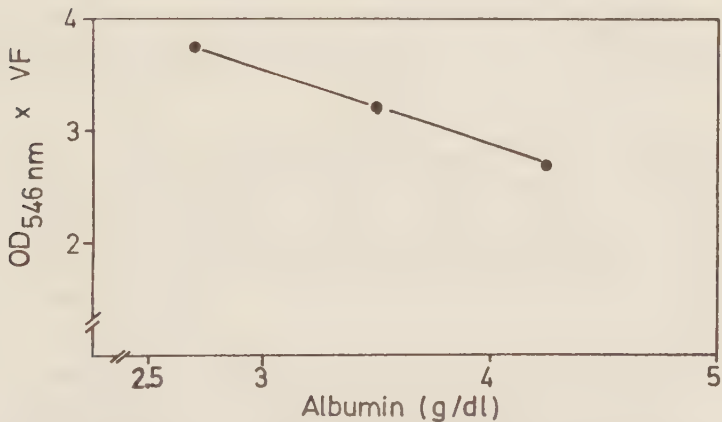


Abb. 10b : Einfluß unterschiedlicher Serumalbuminkonzentration.

Mit zunehmender Albuminkonzentration im Ansatz war eine relative Abnahme der Extinktionsänderung zu beobachten.

3.4.2.2 Absorptionsverhalten des Fast Red TR/Serumalbumin-Gemisches

Albumin-Lösung (3.2 g/dl) wurde als Probe mit Fast Red TR bei pH 5.2 vermessen.

Abbildung 11 zeigt das Extinktionsverhalten des Fast Red TR/Serumalbumin-Gemisches bei unterschiedlichen Wellenlängen.

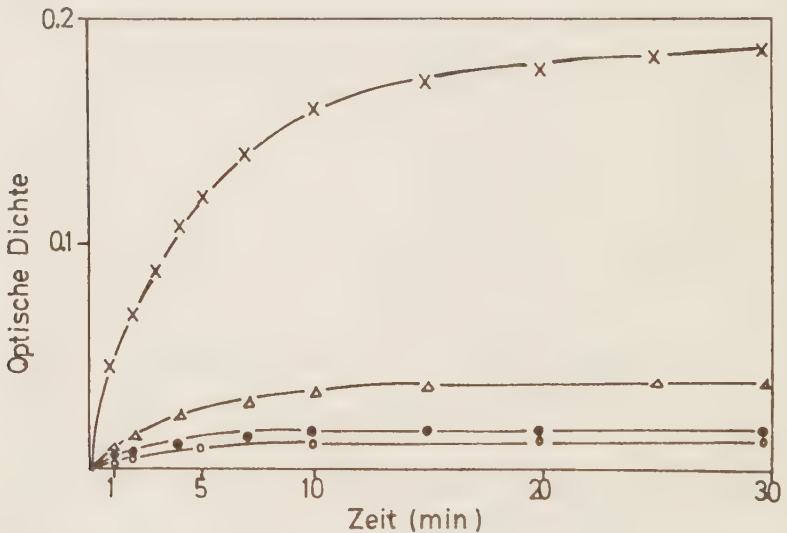


Abb. 11 : Absorptionsverhalten des Albumin-Fast Red TR-Gemisches bei verschiedenen Wellenlängen (x—x334 nm, Δ—Δ365 nm, ●—● 405 nm, ○—○ 546 nm).

Die Extinktionszunahme bei 334 nm beruht möglicherweise auf einer Reaktion von Fast Red TR mit den aromatischen Aminosäuren des Albumins zu unlöslichen Verbindungen (Partikeln), die in der Lage sind, kurzwelliges Licht zu streuen (siehe Abschnitt 3.4.3).

3.4.3 Einfluß von Trübungen

3.4.3.1 Trübungen bei unterschiedlicher mechanischer Handhabung

Albumin-Lösung (25 g/dl) wurde in steigenden Mengen als Probe eingesetzt und mit Fast Red TR bei pH 5.2 nach unterschiedlicher mechanischer Handhabung vermessen:

- a) der Ansatz wurde in Eppendorf-Gefäßen gemischt, gerüttelt und zum Messen in eine Mikroküvette umgefüllt;
- b) der Ansatz wurde in Eppendorf-Gefäßen gemischt, nicht gerüttelt und zum Messen in eine Mikroküvette umgefüllt; anschließend wurde der Ansatz in der Mikroküvette 5 min inkubiert und wieder vermessen;
- c) der Ansatz wurde in Plastikküvetten (sog.K-Küvetten) gemischt, nicht gerüttelt und ohne Umfüllen vermessen; anschließend wurde der Ansatz in den K-Küvetten 10 min inkubiert und wieder vermessen;
- d) die Probenleerwerte wurden mit Tris/Citrat-Puffer pH 5.2 in K-Küvetten gemessen.

Von den gemessenen Extinktionsänderungen wurden die Probenleerwerte subtrahiert. Die so erhaltenen Meßwerte wurden mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren multipliziert und in Abbildung 12 dargestellt.

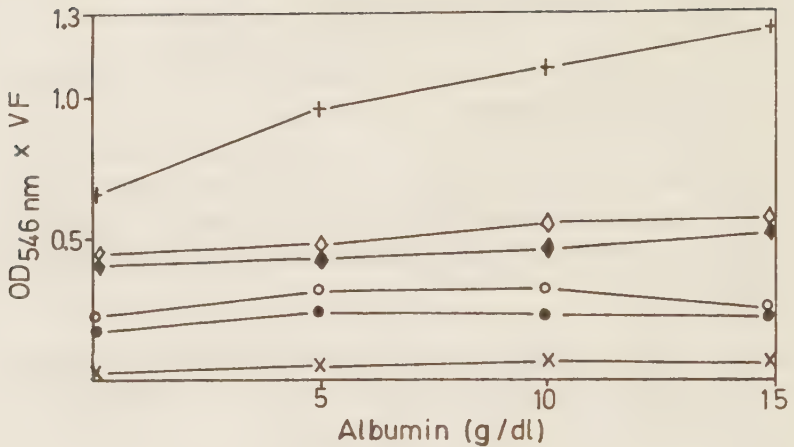


Abb. 12 : Einfluß unterschiedlicher mechanischer Handhabung des Testgemisches bei verschiedenen Albuminkonzentrationen

(+--+in Eppendorf-Gefäßen gemischt, gerüttelt und in einer Mikroküvette gemessen;

◇-◇in Eppendorf-Gefäßen gemischt, nicht gerüttelt, in Mikroküvette gemessen und

◆-◆nach 5 min Inkubation wieder gemessen;

o-o in K-Küvetten gemischt, gemessen und

●-● nach 10 min Inkubation wieder gemessen;

x-x Probenleerwerte).

Die in 3.4.2.2 postulierten "Partikel" aggregieren möglicherweise durch mechanische Manipulationen wie z.B. Rütteln und Umfüllen zu größeren Aggregaten, die auch bei 546 nm das Licht streuen.

Die Extinktionsabnahme durch 5 bzw. 10 min Inkubation ließe sich dann durch ein Absinken dieser Partikel erklären.

3.4.3.2 Darstellung der trübenden Partikel

50 μ l Albumin-Lösung (25 g/dl) wurden mit jeweils 500 μ l Fast Red TR-Reagenz bzw. Tris/Citrat-Puffer pH 5.2 gemischt, 30 min inkubiert, gründlich geschüttelt und zentrifugiert.

Im Fast Red TR/Albumin-Gemisch zeigte sich anschließend ein orangeroter Niederschlag und gelbgefärbter Überstand, wohingegen im Puffer/Albumin-Gemisch kein Niederschlag und keine Verfärbung auftrat.

Die mikroskopische Untersuchung des Niederschlags ergab amorphe Gebilde und orangefarbene längliche Kristallnadeln (Abbildung 13).

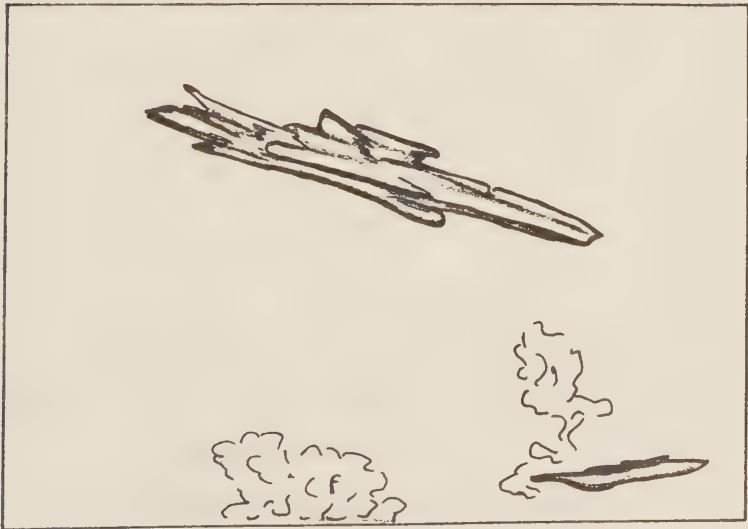


Abb. 13 : Mikroskopisches Bild des im Albumin-Fast Red TR-Gemisch entstandenen Niederschlags (vergrößerter Ausschnitt).

3.4.4 Einfluß von Hämolyse

Serum mit einem Gehalt an Gesamtbilirubin von 6.0 mg/dl, davon 3.5 mg/dl direktreagierendes Bilirubin, wurde durch Zusatz unterschiedlicher Mengen Hämoglobin-Lösung (4.3 g/dl) angereichert und mit Fast Red TR bei pH 5.2 bzw. pH 7.0 vermessen.

Abbildung 14 zeigt die prozentualen Änderungen des Meßsignals für Gesamtbilirubin und direktreagierendes Bilirubin bei unterschiedlichem Hämoglobingehalt der Probe. Zum Vergleich sind auch die Änderungen bei der Bestimmung nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R) bzw. nach Van den Bergh (aca^R) aufgetragen.

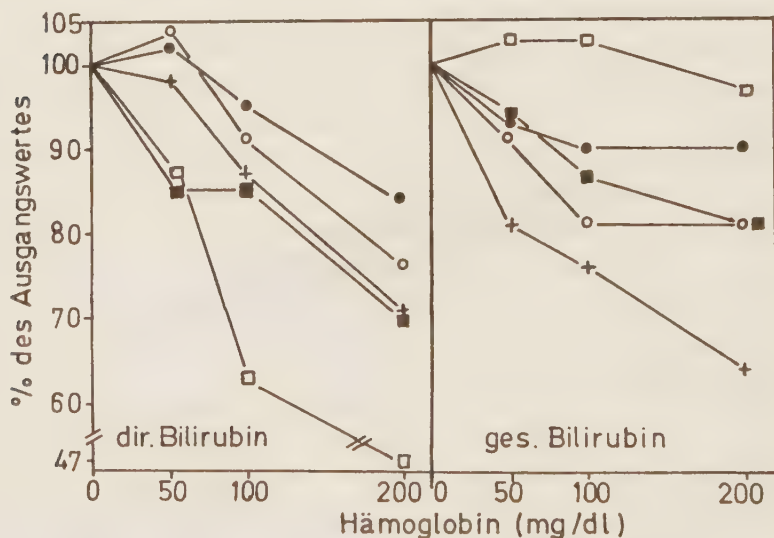


Abb. 14 : Einfluß unterschiedlicher Hämoglobinkonzentration in der Probe auf die Meßwerte für gesamtes und direktes Bilirubin
(Werte mit Fast Red TR nach 5 (•-•), 10 (○-○) und 15 (+•+) min Inkubation, bzw. am aca^R-Analysator (■-■) und im Bilistrat^R-Test (□-□)).

Bei deutlich erkennbarer Hämolyse (200 mg/dl Hämoglobin) war der 10 min-Meßwert für direktreagierendes Bilirubin um 24 %, der 5 min-Meßwert für Gesamtbilirubin um 10 % vermindert.

Die aca^{R} -Meßwerte waren in der gleichen Größenordnung beeinträchtigt. Im Bilistrat $^{\text{R}}$ -Test trat bei der Bestimmung des Gesamtbilirubins keine Störung auf, jedoch zeigte sich bei der Bestimmung des direktreagierenden Bilirubins eine Abnahme des Meßwertes um 53 %.

3.5 Überprüfung verschiedener Testversionen zur Bestimmung des direktreagierenden Bilirubins mit Fast Red TR

3.5.1 Endpunktbestimmung mit Probenleerwert

3.5.1.1 Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten

25 Seren mit unterschiedlichem Gehalt an direktreagierendem Bilirubin wurden mit Fast Red TR-Reagenz bei pH 5.2 gemessen. Die Bilirubinkonzentrationen wurden mit dem in 2.2.2.1 beschriebenen Bilistrat^R-Test nach Jendrassik und Grof ermittelt.

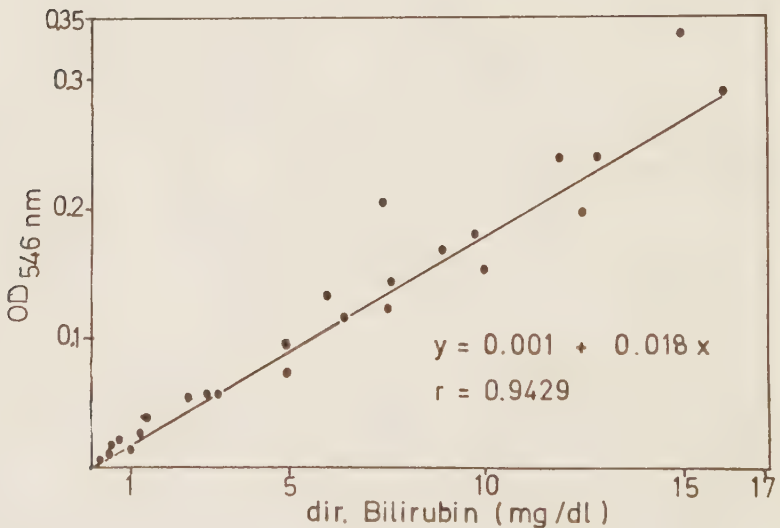


Abb. 15 : Extinktionsänderungen nach der Azokupplungsreaktion von Fast Red TR mit direktem Serum-bilirubin.

In Abbildung 15 sind die Extinktionsänderungen bei 546 nm nach der Reaktion mit Fast Red TR dargestellt. Es ergab sich eine lineare Beziehung mit einem r von 0.9429.

Aus der Steigung der Regressionsgeraden errechnet sich ein molarer Extinktionskoeffizient

$$\epsilon_{\text{app}} = 27.5 \times 10^3 \times 1 \times 1/\text{mol} \times 1/\text{cm}$$

3.5.1.2 Vergleich der mit Fast Red TR bestimmten Bilirubinwerte mit den Meßwerten des Bilistrat^R-Tests

Um den in Abschnitt 3.5.1.1 ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten zu überprüfen wurden an verschiedenen Tagen insgesamt 45 Seren unterschiedlicher Bilirubinkonzentration sowohl mit Fast Red TR bei pH 5.2 als auch nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R) vermessen.

Die mit den beiden Testen erhaltenen Meßwerte für direkt reagierendes Bilirubin sind in Abbildung 16 gegenübergestellt.

Aus der Verteilung der Punkte errechnet sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9279$ für die Gerade $y = -0.08 + 1.09 x$.

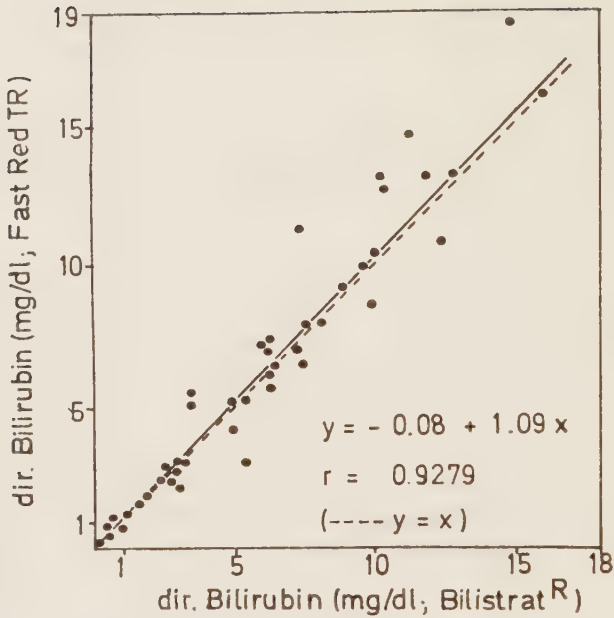


Abb. 16 : Vergleich des Fast Red TR-Tests für direktes Bilirubin mit der Methode nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R).

Die mit Fast Red TR erhaltenen Meßwerte streuen in etwa gleichmäßig um die Winkelhalbierende $y = x$. Aufgrund der relativ großen Abweichung einzelner Werte errechnet sich eine mittlere Gesamtabweichung von 9 % (Steigung der Regressionsgeraden = 1.09).

3.5.1.3 Überprüfung der Linearität für den Fast Red TR-Test

Serum mit 16.1 mg/dl direktreagierendem Bilirubin (nach Jendrassik und Grof bestimmt) wurde mit isotoner NaCl-Lösung (9.0 g/l) verdünnt und mit Fast Red TR bei pH 5.2 vermessen.

Die Meßwerte für die verschiedenen Verdünnungsstufen sind in Abbildung 17 dargestellt.

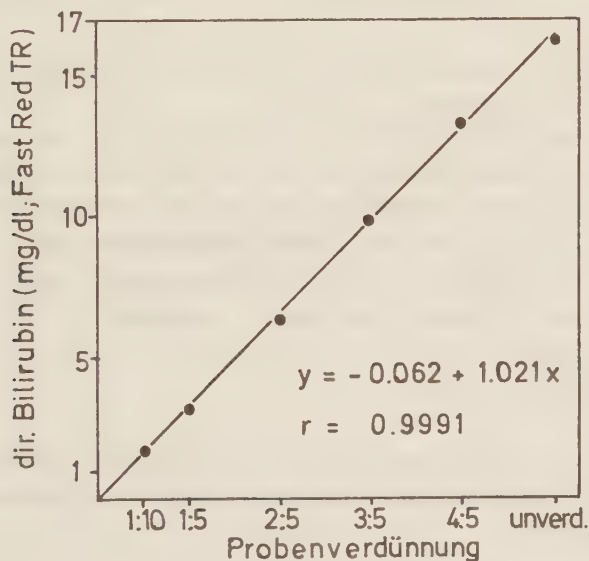


Abb. 17 : Linearität des Fast Red TR-Tests für direktes Bilirubin
(das verwendete Serum enthielt 16.1 mg/dl direktreagierendes Bilirubin).

Es läßt sich daraus eine Linearität des Fast Red TR-Tests bis mindestens 16.1 mg/dl direktreagierendes Bilirubin ablesen.

Höhere Werte wurden nicht geprüft, da sie im Untersuchungszeitraum nicht auftraten. Werte von mehr als 10.0 mg/dl für direktreagierendes Bilirubin sollten aus Sicherheitsgründen ohnehin in verschiedenen Verdünnungsstufen bestätigt werden.

3.5.2 Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart

Hierfür wurde die in 2.2.4 beschriebene Methode wie folgt modifiziert:

Fast Red TR wurde 22 mg/ml in 0.02 mol/l Citronensäure gelöst. Nach Zugabe von 50 µl Fast Red TR-Lösung zu 500 µl 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 5.2 und 20 µl Serum betrug die Fast Red TR-Konzentration in der Küvette 2 mg/ml. Für die Probenleerwerte wurde anstatt Fast Red TR-Lösung Aqua dest. eingesetzt. 10 min nach Reagenzzugabe wurde die Extinktion bei 546 nm und 25°C gemessen.

6 Seren unterschiedlichen Bilirubingehaltes wurden mit dieser modifizierten Methode und dem Bilistrat^R-Test vermessen.

Aus den in Abbildung 18 dargestellten Ergebnissen ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9887$ für die Gerade $y = 0.153 + 1.022 x$.

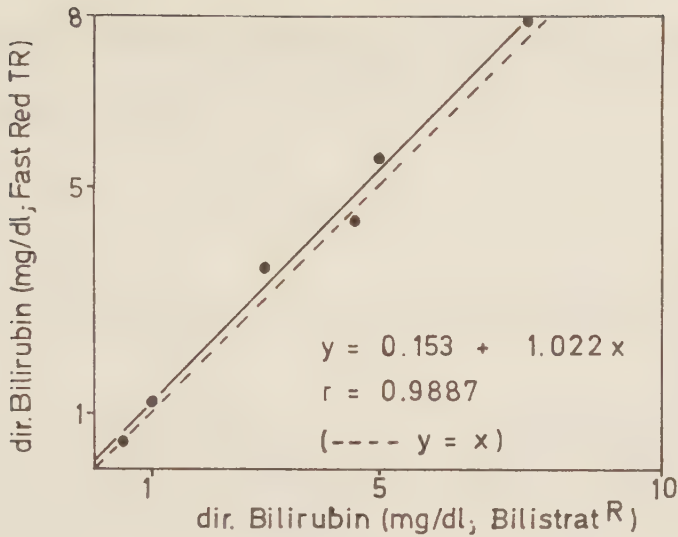


Abb. 18 : Vergleich des modifizierten Fast Red TR-Tests für direktes Bilirubin mit der Methode nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R).

3.5.3 Bestimmung mit 2-Punkt-Kinetik am Zentrifugalanalysator Centrifichem^R

Am Zentrifugalanalysator Centrifichem^R wurden 40 Seren mit Fast Red TR-Reagenz pH 5.2 bei 25°C und 550 nm nach folgendem Ansatz mit einer 2-Punkt-Kinetik ($OD_{10min} - OD_{5sec}$) vermessen:

250 µl Reagenz + 10 µl Serum + 40 µl Aqua dest.

Zum Vergleich wurden die Bilirubinkonzentrationen mit dem Bilistrat^R-Test bestimmt.

Die aus beiden Testen erhaltenen Meßwerte sind in Abbildung 19 gegenübergestellt.

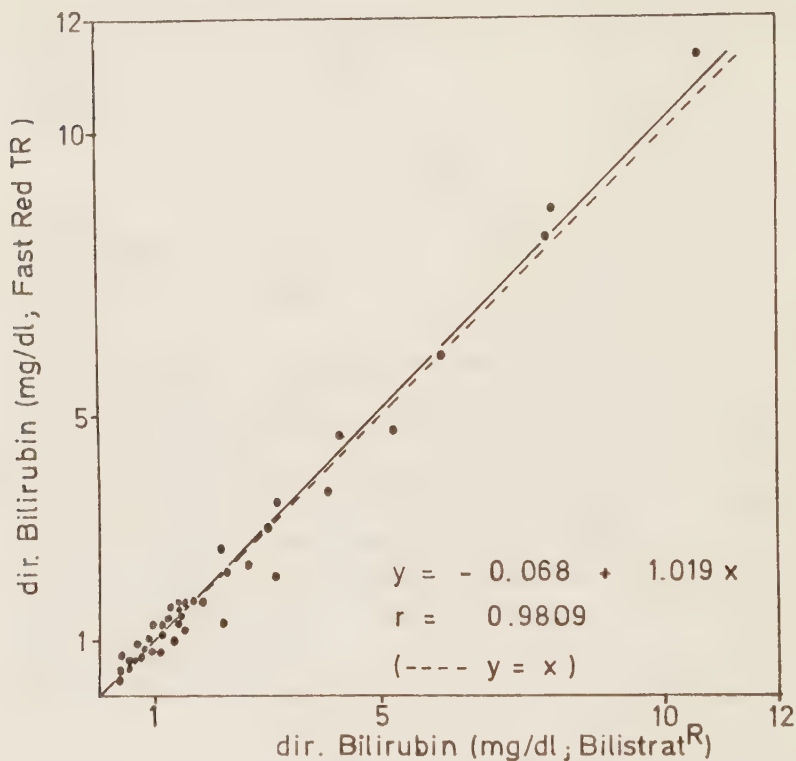


Abb. 19 : Vergleich des Fast Red TR-Tests für direktes Bilirubin am Centrifichem^R-Analysator mit der Methode nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R).

Es ergibt sich daraus ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9809$ für die Gerade $y = -0.068 + 1.019 x$.

Die Ergebnisse beider Teste stimmten nahezu völlig überein.

Für die gleichzeitig geprüfte Präzision in Serie ergab sich für $n = 12$ ein Variationskoeffizient VK von 7.0 % für $MW = 1.25 \text{ mg/dl}$ ($SD \pm 0.088$).

3.5.4 Endpunktbestimmung am Selektivanalysator RA 1000^R

29 Seren unterschiedlicher Bilirubinkonzentration wurden mit Fast Red TR pH 5.2 nach folgendem Ansatz am Selektivanalysator RA 1000^R bei 550 nm und 37°C nach 8.5 min Inkubation vermessen:

350 μl Reagenz + 14 μl Serum.

Die Probenleerwerte wurden mit 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 5.2 bestimmt.

Die so erhaltenen Meßwerte sind in Abbildung 20 gegen die Ergebnisse aus dem Bilistrat^R-Test aufgetragen.

Daraus ergibt sich für die Gerade $y = -0.142 + 1.062 x$ ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9933$.

Die Meßwerte beider Teste stimmten gut überein.

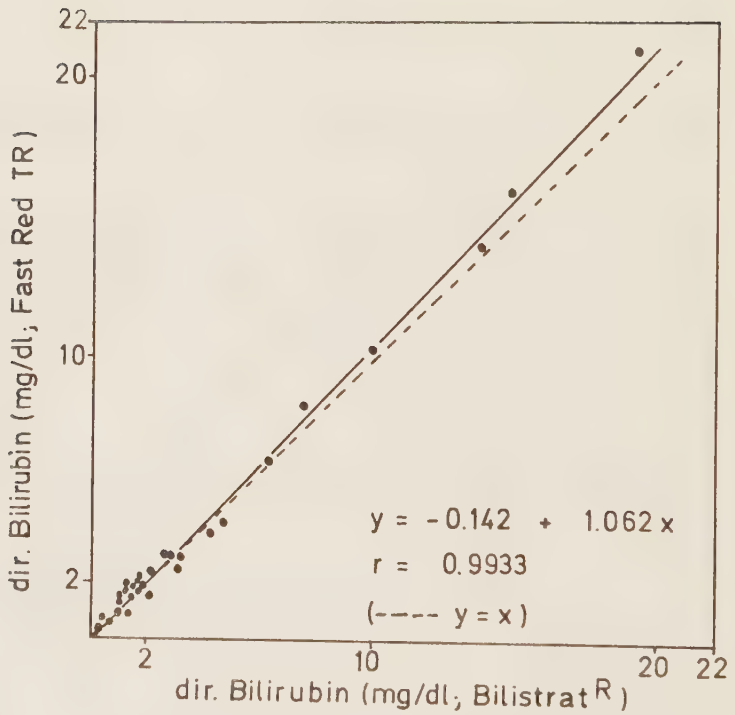


Abb. 20 : Vergleich des Fast Red TR-Tests für direktes Bilirubin am RA 1000^R-Analysator mit der Methode nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R).

3.5.5 Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart am Batchanalysator ACP 5040 R

Die in 2.2.4 beschriebene Methode wurde hierfür wie folgt modifiziert:

Fast Red TR wurde in einer Konzentration von 22 mg/dl in 0.02 mol/l Citronensäure gelöst. Nach Zugabe von 25 µl Reagenz zu 250 µl 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 5.2 und 10 µl Serum betrug die Fast Red TR-Konzentration in der Küvette 2 mg/ml. Als Leerwert diente 0.02 mol/l Citronensäure.

In 16 Seren unterschiedlichen Bilirubingehaltes wurde 6 min nach Reagenz-Zugabe die Extinktionsänderung bei 546 nm und 25°C gemessen.

Die so erhaltenen Meßwerte sind in Abbildung 21 den Meßwerten des aca^R-Analysators gegenübergestellt.

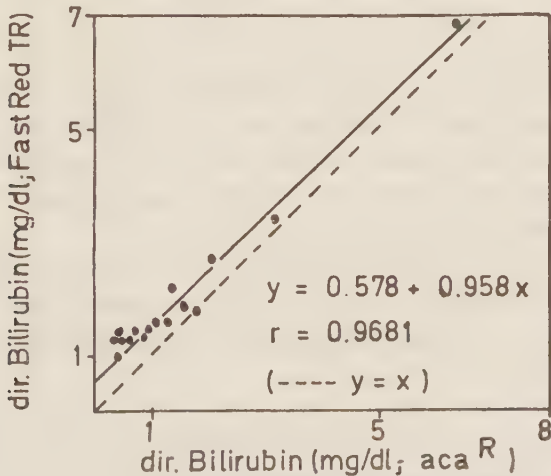


Abb. 21 : Vergleich des Fast Red TR-Tests für direktes Bilirubin am ACP 5040^R-Analysator mit der Methode nach Van den Bergh (aca^R).

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9681$ für die Gerade $y = 0.578 + 0.958 x$.

Die Meßwerte des ACP^R liegen demnach durchschnittlich um 0.6 mg/dl höher als die Ergebnisse aus dem Bilistrat^R-Test.

Berücksichtigt man den für diese Methode mit Aqua dest. als Probe bestimmten Reagenzienleerwert von 0.6 mg/dl (SD ± 0.1), so stimmen die Meßwerte beider Teste gut überein.

3.5.6 Kinetische Bestimmung am Batchanalysator ACP 5040^R

Nach dem Ansatz "250 μ l Reagenz + 10 μ l Serum" wurde mit Fast Red TR-Reagenz pH 5.2 am Batchanalysator ACP 5040^R in 14 Patientenseren und einem Neugeborenenserum die Konzentration an direktreagierendem Bilirubin bestimmt.

Nach 2.5 min Inkubation bei 25°C wurden die Extinktionsänderungen bei 546 nm gemessen. Als Standard wurde ein Serum definierter Bilirubinkonzentration verwendet.

Abbildung 22 zeigt diese Meßwerte im Vergleich zu den vom aca^R ermittelten Ergebnissen.

Aus dieser Darstellung ergibt sich für die Gerade $y = 0.18 + 0.989 x$ ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9764$.

Es zeigt sich zumindest im pathologisch erhöhten Bereich eine gute Übereinstimmung beider Tests. Bei Werten unter 1.0 mg/dl (aca^R) fielen die ACP^R -Werte mit einer Ausnahme relativ hoch aus.

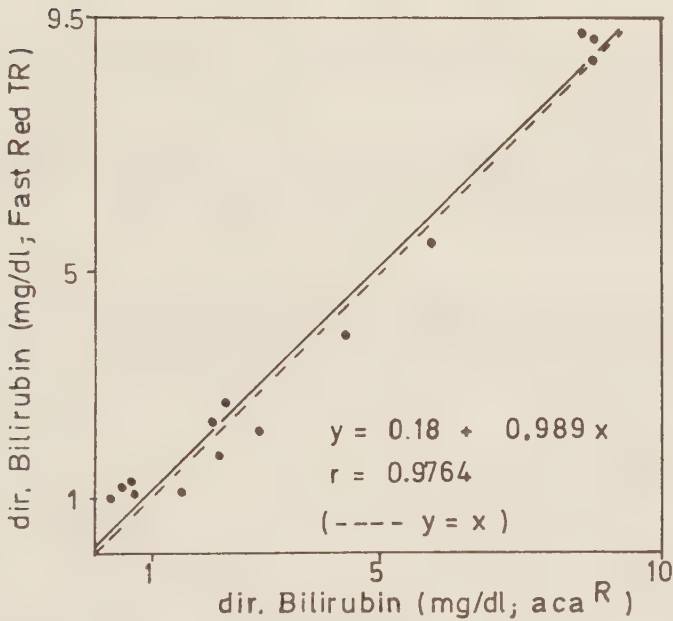


Abb. 22 : Vergleich des kinetischen Fast Red TR-Tests für direktes Bilirubin am ACP 5040^R -Analysegerät mit der Methode nach Van den Bergh (aca^R).

3.6 Überprüfung verschiedener Testversionen zur Bestimmung des Gesamtbilirubins mit Fast Red TR

3.6.1 Endpunktbestimmung mit Probenleerwert

3.6.1.1 Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten

20 Seren unterschiedlichen Bilirubingehaltes wurden wie in 2.2.4 beschrieben mit Fast Red TR-Reagenz pH 7.0 gemessen.

Die Bilirubinkonzentrationen wurden nach Jendrassik und Grof mit dem in 2.2.2.1 dargestellten Bilistrat^R-Test ermittelt.

Die beobachteten Extinktionsänderungen bei 546 nm sind in Abbildung 23 aufgetragen.

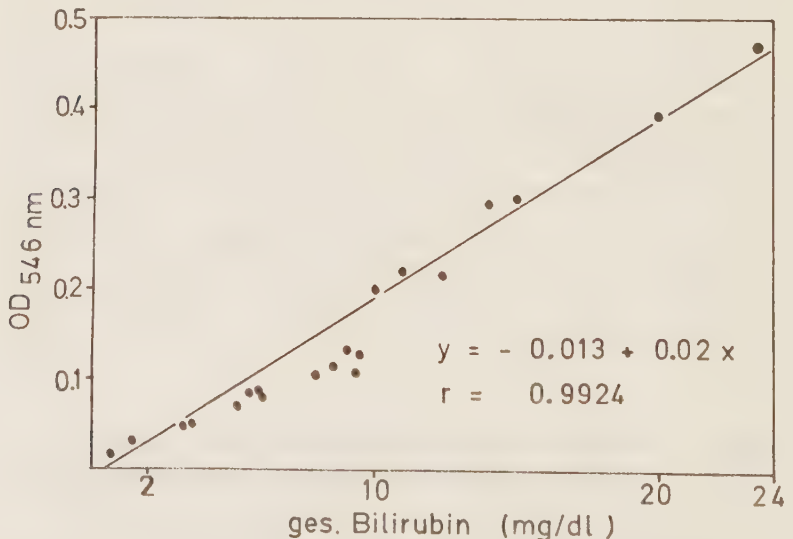


Abb. 23 : Extinktionsänderungen nach der Azokupplungsreaktion von Fast Red TR mit Gesamtbilirubin.

Es errechnet sich aus den Meßwerten ein molarer Extinktionskoeffizient

$$\epsilon_{app} = 28.4 \times 10^3 \times 1 \times 1/\text{mol} \times 1/\text{cm}$$

der somit demjenigen für direktreagierendes Bilirubin sehr nahe kam (vgl. Abschnitt 3.5.1.1).

3.6.1.2 Vergleich der mit Fast Red TR bestimmten Bilirubinwerte mit den Meßwerten des Bilistrat^R-Tests

Dazu wurden an verschiedenen Tagen insgesamt 40 Seren mit Fast Red TR-Reagenz pH 7.0 bzw. mit dem Bilistrat^R-Test vermessen und die so erhaltenen Ergebnisse in Abbildung 24 gegenübergestellt.

Es ergibt sich daraus für die Gerade $y = -0.235 + 1.067 x$ ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9946$.

Die Meßwerte beider Teste stimmten im Bereich von 0 bis 10.0 mg/dl sehr gut überein. Erst bei höheren Werten wirkte sich die Abweichung von der Winkelhalbierenden um 6.7 % im Sinne zu hoher Werte aus.

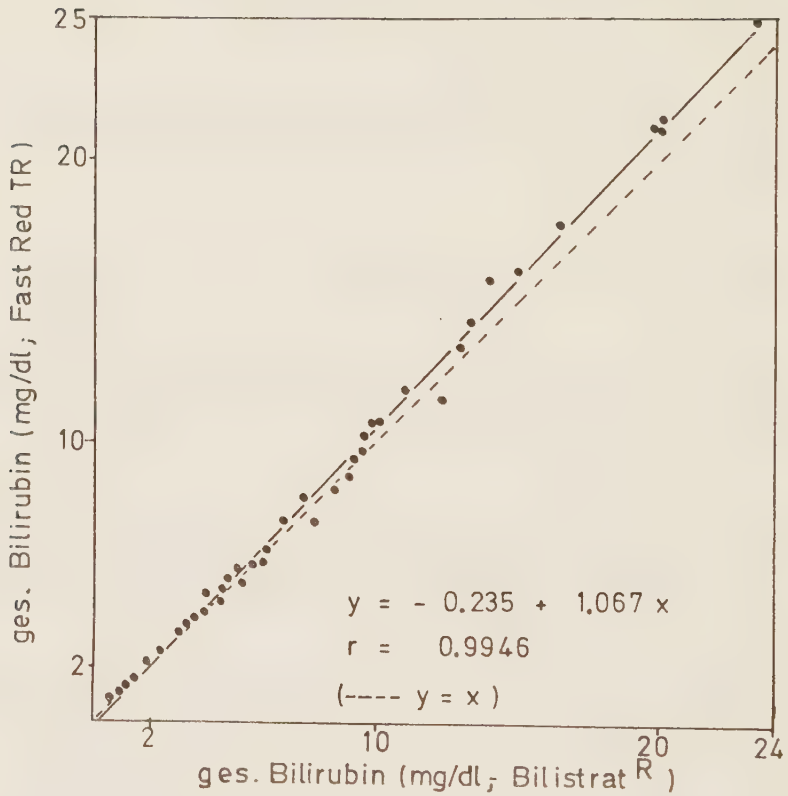


Abb. 24 : Vergleich des Fast Red TR-Tests für gesamtes Bilirubin mit der Methode nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R).

3.6.1.3 Überprüfung der Linearität für den Fast Red TR-Test

Serum mit 23.5 mg/dl Gesamtbilirubin im Bilistrat^R-Test (= 25.1 mg/dl im Fast Red TR-Test) wurde mit isotoner NaCl-Lösung (9.0 g/l) verdünnt und mit Fast Red TR-Reagenz pH 7.0 vermessen.

Die bei den verschiedenen Verdünnungsstufen erhaltenen Meßwerte wurden in Abbildung 25 dargestellt.

Es zeigt sich eine im gesamten Verdünnungsbereich lineare Verdünnungskurve.

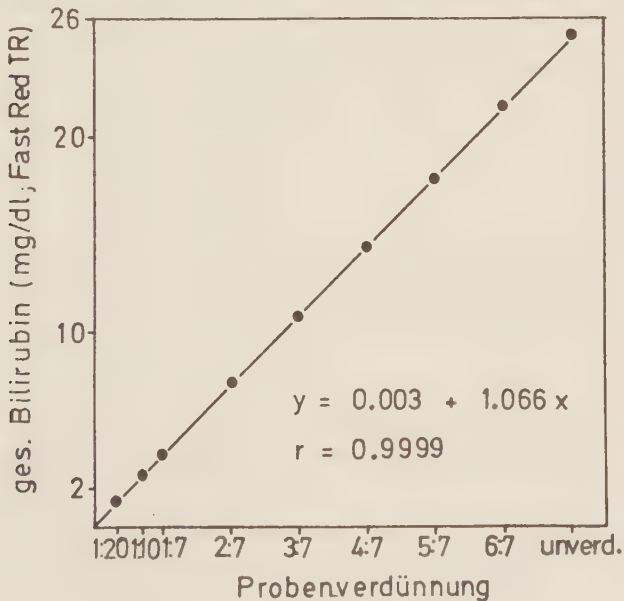


Abb. 25 : Linearität des Fast Red TR-Tests für gesamtes Bilirubin
(das verwendete Serum enthielt 23.5 mg/dl gesamtes Bilirubin).

3.6.2 Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart

Hierfür wurde die in 2.2.4 beschriebene Methode folgendermaßen modifiziert:

Fast Red TR wurde in einer Konzentration von 22 mg/ml in 0.02 mol/l Citronensäure gelöst. Nach Zugabe von 50 µl Fast Red TR-Lösung zu 500 µl 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0 und 20 µl Serum betrug die Fast Red TR-Konzentration in der Küvette 2 mg/ml. Für die Probenleerwerte wurde Aqua dest. anstelle der Reagenzlösung eingesetzt. 10 min nach Reagenzzugabe wurde die Extinktionsänderung bei 546 nm und 25°C gemessen.

8 Seren unterschiedlichen Bilirubingehaltes wurden mit diesem modifizierten Test und dem Bilistrat^R-Test vermessen.

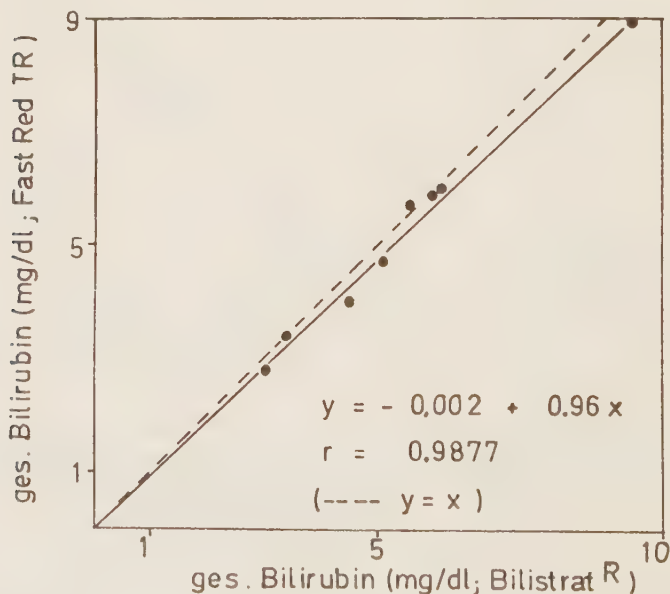


Abb. 26 : Vergleich des modifizierten Fast Red TR-Tests für gesamtes Bilirubin mit der Methode nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

Für die Gerade $y = -0.002 + 0.96 x$ ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9877$.

Die Meßwerte beider Teste stimmen gut überein.

3.6.3 Endpunktbestimmung am Selektivanalysator RA 1000^R

20 Seren wurden mit Fast Red TR-Reagenz pH 7.0 am Selektivanalysator RA 1000^R nach folgendem Ansatz gemessen:

350 µl Reagenz + 14 µl Serum.

Die Probenleerwerte wurden mit 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.0 bestimmt. Nach 8.5 min Inkubation bei 37°C wurde die Extinktionsänderung bei 550 nm gemessen.

Die so erhaltenen Meßwerte wurden in Abbildung 27 den Ergebnissen aus dem Bilistrat^R-Test gegenübergestellt.

Daraus ergibt sich für die Gerade $y = 0.394 + 1.01 x$ ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9924$.

Subtrahiert man den für Aqua dest. als Probe erhaltenen Reagenzienleerwert von 0.2 mg/dl ± 0.1 von den Meßwerten im Fast Red TR-Test, so stimmen die Ergebnisse beider Teste sehr gut überein.

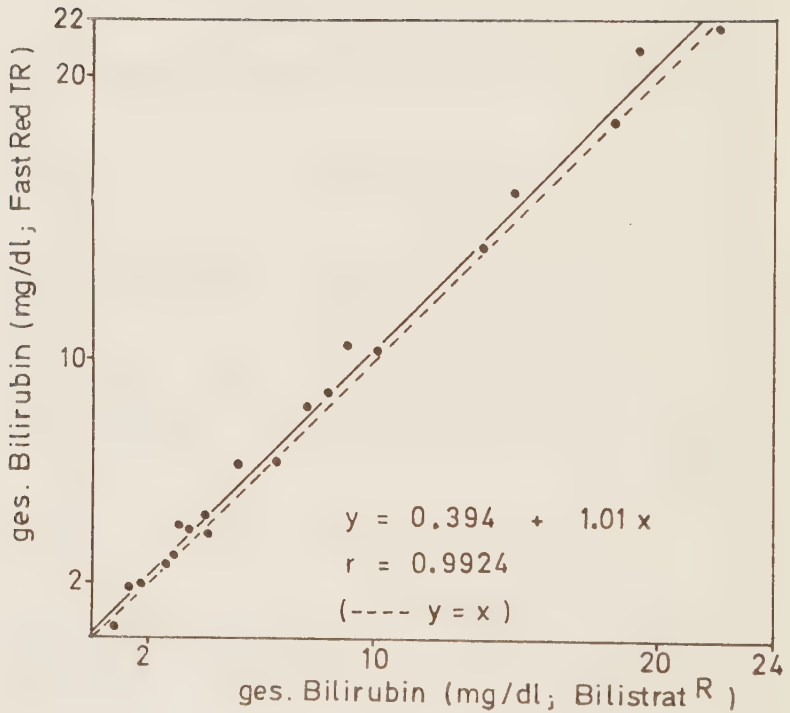


Abb. 27 : Vergleich des Fast Red TR-Tests für gesamtes Bilirubin am RA 1000^R-Analysator mit der Methode nach Jendrassik und Grof (Bilistrat^R).

3.6.4 Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart am Batchanalysator ACP 5040^R

Die in 2.2.4 beschriebene Methode wurde hierfür folgendermaßen modifiziert:

Fast Red TR wurde in einer Konzentration von 22 mg/ml in 0.02 mol/l Citronensäure gelöst. Nach Zugabe von 25 µl Reagenz zu 250 µl 0.2 mol/l Tris/Citrat-Puffer pH 7.1 und 10 µl Serum betrug die Fast Red TR-Konzentration in der Küvette 2 mg/ml. Als Leerwertreagenz diente 0.02 mol/l Citronensäure.

Für 17 Seren unterschiedlichen Bilirubingehaltes wurde 4 min nach Reagenzzugabe die Extinktionsänderung bei 546 nm und 25°C gemessen.

In Abbildung 28 wurden diese Meßwerte gegen die Ergebnisse des Bilirubina frazionata^R-Tests nach Jendrassik und Grof aufgetragen.

Für die daraus resultierende Gerade $y = 0.046 + x$ errechnet sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.98$.

Mit beiden Testen erhält man gut übereinstimmende Ergebnisse.

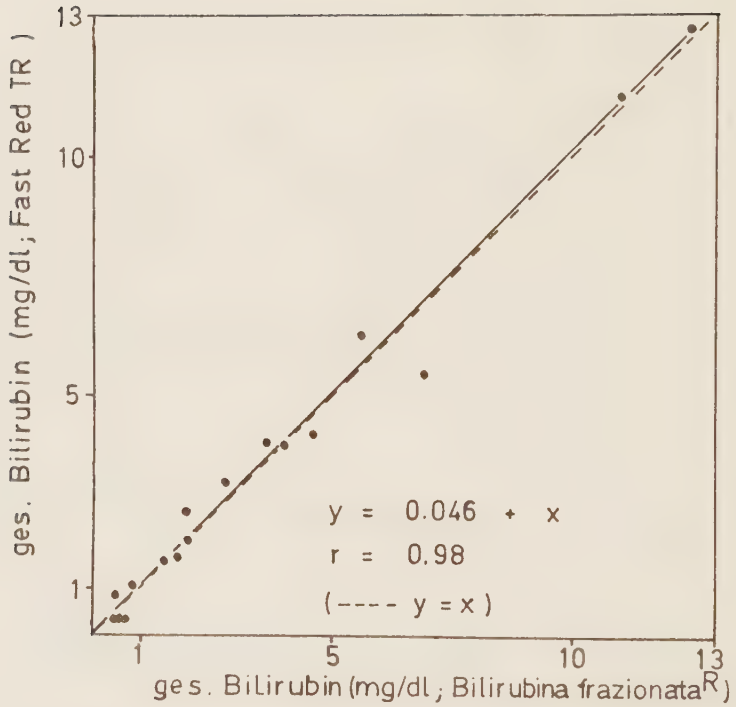


Abb. 28 : Vergleich des Fast Red TR-Tests für gesamtes Bilirubin am ACP 5040^R-Analysator mit der Methode nach Jendrassik und Grof (Bilirubina frazionata^R).

3.6.5 Kinetische Bestimmung am Batchanalysator ACP 5040^R

In 22 Seren wurde mit Fast Red TR-Reagenz pH 7.0 am ACP 5040^R die Konzentration des Gesamtbilirubins nach dem Ansatz "250 µl Reagenz + 10 µl Serum" bestimmt. Nach 1 min Inkubation bei 25°C wurde die Extinktionsänderung bei 546 nm gemessen.

Als Standard wurde ein Serum definierter Bilirubinkonzentration verwendet.

Die so erhaltenen Meßwerte wurden in Abbildung 29 gegenüber den mit der DPD^R-Methode (siehe Abschnitt 2.2.3.1) ermittelten Ergebnissen dargestellt.

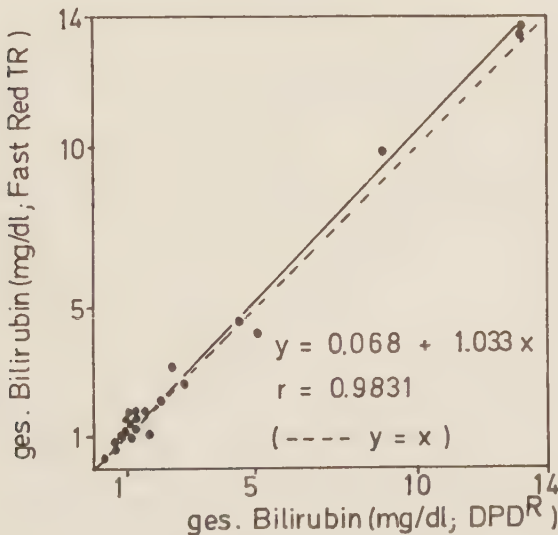


Abb. 29 : Vergleich des kinetischen Fast Red TR-Tests für gesamtes Bilirubin am ACP 5040^R-Analyseator mit der Methode nach Wahlefeld (DPD^R).

Für die Gerade $y = 0.068 + 1.033 x$ ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9831$.

Die Meßwerte aus beiden Testen stimmten nahezu überein.

Für die gleichzeitig geprüfte Präzision in Serie ergab sich für $n = 6$ ein Variationskoeffizient VK von 1.0 % für $MW = 13.75 \text{ mg/dl}$ ($SD \pm 0.1378$).

3.7 Vergleichsuntersuchungen zur Bestimmung des Gesamtbilirubins mit Fast Violet B

3.7.1 Endpunktbestimmung mit Probenleerwert

3.7.1.1 Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten

Fast Violet B wurde in einer Konzentration von 8 mmol/l in 0.2 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7.2 gelöst. 15 Seren unterschiedlichen Bilirubingehaltes wurden wie in 2.2.4 beschrieben vermessen. Für die Probenleerwerte wurde 0.2 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7.2 verwendet.

Die Bilirubinkonzentrationen wurden am aca^R-Analysator ermittelt.

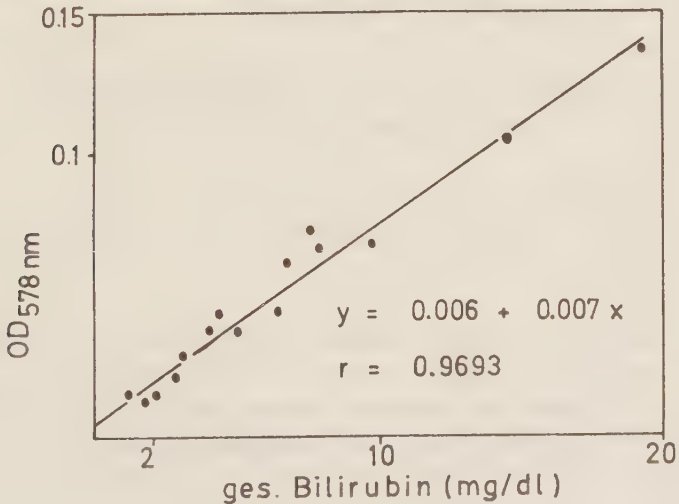


Abb. 30 : Extinktionsänderungen nach der Azokupplungsreaktion von Fast Violet B mit dem gesamten Serumbilirubin.

Die beobachteten Extinktionsänderungen bei 578 nm und 25°C wurden in Abbildung 30 aufgetragen.

Aus den Meßwerten errechnet sich ein molarer Extinktionskoeffizient

$$\epsilon_{app} = 11.5 \times 10^3 \times l \times 1/\text{mol} \times 1/\text{cm}$$

3.7.1.2 Vergleich der mit Fast Violet B bestimmten Bilirubinwerte mit den Meßwerten des Analysengerätes aca^R

17 Seren wurden sowohl mit dem Fast Violet B-Reagenz pH 7.2 als auch am aca^R vermessen.

Die mit beiden Testen erhaltenen Meßwerte wurden in Abbildung 31 gegenübergestellt.

Für die daraus resultierende Gerade $y = 0.933 + 0.915x$ errechnet sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9189$.

Bei Berücksichtigung des mit Aqua dest. als Probe bestimmten Reagenzienleerwertes von 0.5 mg/dl (SD ± 0.2) stimmen die Meßwerte beider Teste zumindest im Bereich von 0 bis 10.0 mg/dl annähernd überein.

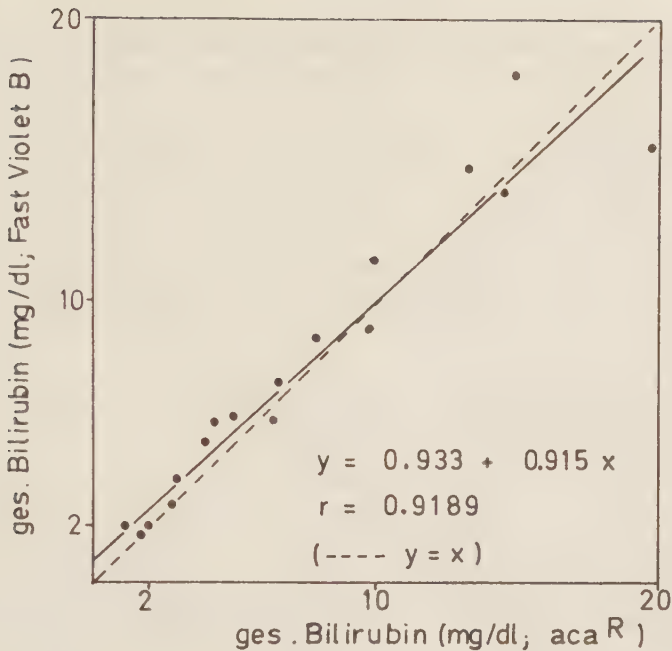


Abb. 31 : Vergleich des Fast Violet B-Tests für gesamtes Bilirubin mit der Methode nach Van den Bergh (aca^R).

3.7.2 Endpunktbestimmung am Selektivanalysator RA 1000^R

25 Seren unterschiedlichen Bilirubingehaltes wurden am Selektivanalysator RA 1000^R mit Fast Violet B-Reagenz pH 7.2 nach dem Ansatz "350 µl Reagenz + 14 µl Serum" vermessen. Die Probenleerwerte wurden mit 0.2 mol/l Tris/HCl-Puffer pH 7.2 bestimmt. Nach 8.5 min Inkubation bei 37°C wurde die Extinktionsänderung bei 600 nm gemessen.

Die Meßwerte des Fast Violet B-Tests wurden in Abbildung 32 gegen die Ergebnisse der DPD^R-Methode - aufgetragen.

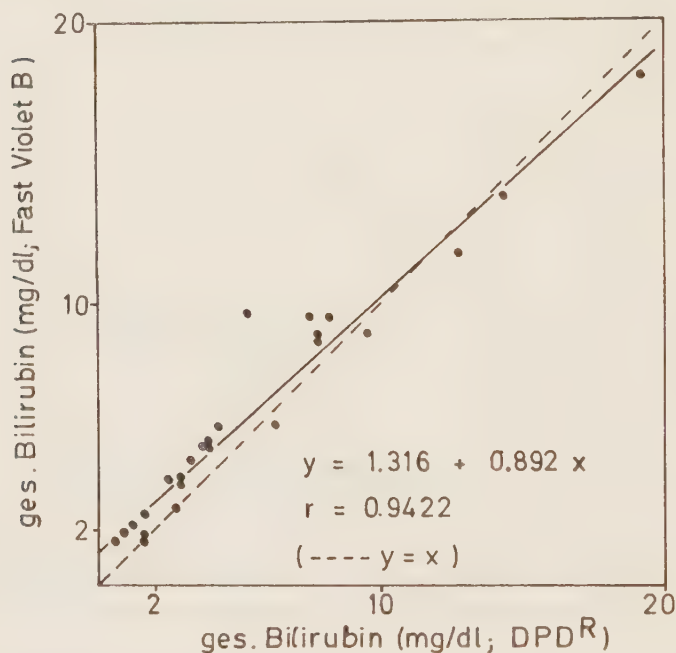


Abb. 32 : Vergleich des Fast Violet B-Tests für gesamtes Bilirubin am RA 1000^R-Analysator mit der Methode nach Wahlefeld (DPD^R).

Für die Gerade $y = 1.316 + 0.892 x$ ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.9422$.

Selbst bei Berücksichtigung des mit Aqua dest. als Probe ermittelten Reagenzienleerwertes von 0.6 mg/dl (SD ± 0.3) liegen die Meßwerte des Fast Violet B-Tests im Bereich von 0 bis 10.0 mg/dl über denen der Vergleichsmethode.

3.8 Überprüfung der Fast Red TR-Tests durch Bilirubinbestimmung in Gallenflüssigkeit

Menschliche Blasengalle wurde mit isotoner NaCl-Lösung (9.0 g/l) verdünnt und wie in 2.2.4 beschrieben mit Fast Red TR-Reagenz pH 5.2 bzw. pH 7.0 vermessen. Zum Vergleich wurde der Bilirubingehalt der Galle mit dem aca^R-Analysengerät ermittelt (Tabelle 1).

Tabelle 1 : Bilirubinbestimmung in Gallenflüssigkeit

Methode	Verdünnung	Meßwert	Ergebnis

Fast Red TR pH 5.2	1 : 60	6.2 mg/dl	372 mg/dl
Fast Red TR pH 7.0	1 : 60	5.2 mg/dl	312 mg/dl
aca ^R -Analysator	1 : 20	18.24 mg/dl	365 mg/dl

Bilirubin wird mit Fast Red TR im Vergleich zu herkömmlichen Methoden ebenso gut erfaßt.

4. Diskussion

Der Gesamtbilirubingehalt des Serums setzt sich aus verschiedenen Fraktionen zusammen (24,25).

Das unkonjugierte α -Bilirubin, auch als indirektes Bilirubin bezeichnet, ist wegen seiner hydrophoben Eigenschaften im Plasma vorwiegend an Albumin gebunden. Die bilirubinbindenden Rezeptoren des Albumins wurden 1982 von Fellows und Hird (11) identifiziert. Unabhängig voneinander beschrieben 1956/57 Billing et al. (1), Schmid (37) und Talafant (41) das direkt reagierende Bilirubin als monoglucuronidiertes β - und diglucuronidiertes γ -Bilirubin.

Lauff et al. (23) gelang es 1982 mittels einer von ihnen entwickelten HPLC-Methode aus Humanserum eine weitere Bilirubinfraction, das kovalent an Albumin gebundene δ -Bilirubin zu isolieren. Weiss et al. (46) beobachteten das Auftreten dieser δ -Fraktion häufig im Anschluß an eine exzessive Akkumulation von glucuronidiertem Bilirubin, nicht dagegen bei "indirekten" Hyperbilirubinämien und Gesunden. So fanden diese Autoren, wie auch Blanckaert und D'Argenio (2), bei Cholestase-Patienten mit zunehmendem Ikterus circa 30% des Gesamtbilirubins, bei ablassendem Ikterus nach Beseitigung des Abflußhindernisses circa 80 % des Gesamtbilirubins als δ -Bilirubin.

Die darüberhinausgehende klinische Bedeutung dieser δ -Bilirubinfraction ist noch weitgehend ungesichert.

Die klassischen Nachweisverfahren für Bilirubin unterscheiden allerdings nur zwei Fraktionen. Das hydrophilere "direkte" Bilirubin, das im wässrigen Milieu rasch abreagiert, umfaßt sowohl β -, γ - als auch δ -Bilirubin. Das hydrophobere "indirekte" Bilirubin dagegen besteht aus unkonjugiertem α -Bilirubin und wird mit den üblichen Verfahren erst nach Zusatz von

Lösungsvermittlern wie Alkohol oder Detergenzien erfaßt (24,35,46).

Ausgehend von der von Hoffmann und Weiss (17) beschriebenen Beobachtung, daß direktreagierendes Bilirubin die Bestimmung der sauren Phosphatase mit Fast Red TR (16) durch Bildung eines Azofarbstoffes stört, zeigen die hier dargestellten Experimente, unter welchen allgemeinen Bedingungen Bilirubin mit Azokupplungsreaktionen interferiert.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse liefern auch Anhaltspunkte für die Entwicklung von Methoden, die sowohl das direktreagierende als auch das gesamte Bilirubin der Messung mit stabilen Diazoniumsalzen der Tetrafluorborsäure (30,38) zugänglich machen.

So ist die hier beobachtete starke pH-Abhängigkeit der Azokupplungsreaktion nach Fieser und Fieser (12) unter anderem dadurch bedingt, daß bei der Kupplung des Diazoniumkations mit dem Pyrrolring des Bilirubins Protonen nach folgender vereinfachter Reaktionsgleichung abgespalten werden:



(Ar = aromatischer Rest, N_2^+ = Diazoniumkation,
P = Pyrrolring des Bilirubins)

Im sauren pH-Bereich ist das Reaktionsgleichgewicht nach links verschoben, so daß Bilirubin, und zwar vor allem das hydrophobe, an Albuminrezeptoren gebundene α -Bilirubin (11,21,38,46) nur sehr langsam reagiert (siehe Abbildung 3). Bei Meßzeiten von wenigen Minuten, wie sie Chu et al. (4) 1982 für ihre Methode beschrieben haben, können die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, daß das direktreagierende Bilirubin im

Serum selektiv erfaßt wird (21).

Bei Erhöhung des pH-Wertes verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht der Azokupplung nach rechts. Hierbei nimmt die Reaktivität des Diazoniumkations gegenüber dem Pyrrolring des Bilirubins zu und kann so einen Zustand der "Überreaktivität" erreichen. Dieser ist durch raschen Reagenzienverfall (siehe Abbildung 8a) und die Bildung instabiler Farbstoffe (siehe Abbildung 8b) gekennzeichnet.

Bei diesen instabilen Azopigmenten dürfte es sich um Triazene des Bilirubins handeln, die nach Schwertlick (38) bzw. Fieser und Fieser (12) durch die Kupplung des Diazoniumkations mit dem Stickstoff im Pyrrolring entstehen:



($\text{HN} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ = Ausschnitt aus dem Pyrrolring des Bilirubins,
Ar = aromatischer Rest, N_2^+ = Diazoniumkation)

Die so entstandenen Triazenverbindungen können entweder unter Abspaltung von gasförmigem Stickstoff zerfallen oder durch Umlagerung in andere Produkte mit höherer Stabilität übergehen (12,30).

Der gleichzeitig beobachtete Reagenzienverfall geht nach Fieser und Fieser (12) in zwei Schritten vorsich:



(Ar = aromatischer Rest, N_2^+ = Diazoniumkation)

Zunächst entsteht aus dem Diazoniumsalz unter Freisetzung von gasförmigem Stickstoff das entsprechende Phenol (sogenannte Phenolverkokung). Dieses kuppelt mit überschüssigem Diazoniumreagenz zu schwerlöslichen, oft tief gefärbten Azofarbstoffen. Dabei nimmt im pH-Bereich von 5 - 8 die Reaktionsgeschwindigkeit der Kupplung eines Phenols zu, da mit steigendem pH-Wert auch die Zahl der reaktionsfähigen Phenolat-Ionen wächst. Die Tatsache, daß das Diazoniumkation stärker vom Ring des Phenolat-Ions als von dem des Phenols angezogen wird, ist eine Auswirkung des induktiven und des Resonanz-Effektes des negativ geladenen Sauerstoffs, die eine Erhöhung der Elektronendichte in den Kernstellungen ortho- und para- zur Folge haben. Beide Phänomene waren in den vorliegenden Versuchen besonders bei der Verwendung der Halogenverbindung 2,5-Dichlor-diazobenzol (BM 31.094) deutlich zu beobachten.

Die hier beschriebene pH-Abhängigkeit der analytisch verwertbaren Farbreaktion und der auftretenden Nebenreaktionen war bei den verschiedenen Diazoniumsalzen unterschiedlich stark ausgeprägt. So zeigten die Reagenzlösungen des 4-Sulfonyl-diazobenzols (BM 31.612), des 2-Methyl-4-sulfonyl-diazobenzols (BM 31.613) und der para-Aminobenzoessäure (BM 31.614) bereits bei pH-Werten unter 5 eine deutliche Reaktion mit indirektem Bilirubin, wohingegen die Reagenzlösungen des 2-Methyl-4-chlor-diazobenzols (Fast Red TR), des 2-Methoxy-5-chlor-diazobenzols (Fast Red RC) und des 2-Methoxy-5-methyl-4-benzamido-diazobenzols (Fast Violet B) erst im pH-Bereich um 7 mit indirektem Bilirubin reagierten. Das 2,5-Dichlor-diazobenzol war selbst in saurer Lösung sehr instabil.

Daraus ist zu schließen, daß die chemische Struktur der Diazoniumverbindung, insbesondere die Art und Stellung der Substituenten am Benzolring, die Reaktivität des Diazoniumkations mitbestimmt.

Ein Vergleich der getesteten Diazoniumverbindungen zeigt, daß "elektronenanziehende" Gruppen (z.B. Halogene oder Sulfonylgruppen) in ortho- oder para-Stellung zur Diazoniumgruppe den elektrophilen Charakter des Diazoniumkations und damit die Reaktivität steigern, während "elektronenschiebende" Substituenten (z.B. Methylgruppen) reaktionsverlangsamend wirken. Es liegt nahe anzunehmen, daß dadurch die Elektronendichte am Diazoniumkation erhöht bzw. erniedrigt wird und somit dessen elektrophiler Angriff am Bilirubinmolekül erschwert bzw. erleichtert wird.

Die bei der Bilirubinbestimmung nach Jendrassik und Grof (21) verwendete diazotierte Sulfanilsäure wäre in diesem Sinne etwa gleich mit der diazotierten para-Aminobenzoesäure (BM 31.614) einzuordnen. Tatsächlich wird bei dieser klassischen Methode (21) "direktes" Bilirubin nur im pH-Bereich um 2 relativ selektiv erfaßt. Nach den Beobachtungen von Lo und Wu (26) wird hierbei aber trotzdem noch unkonjugiertes Bilirubin teilweise als direktreagierendes Bilirubin mitgemessen. Bei pH-Werten um 5 tritt hier bereits rascher Reagenzienverfall und die Bildung instabiler Azofarbstoffe ein.

Die Diazoniumsalze Fast Red TR und Fast Violet B sind hingegen so reaktionsträge, daß sie für die Bestimmung von direktem Bilirubin bei pH-Werten um 5 geeignet sind. Dies ist vorteilhaft, da im annähernd neutralen pH-Bereich störende Präzipitationen von Serumproteinen (38) vermieden werden.

Nach Fieser und Fieser (12) ist die diazotierte Sulfanilsäure wegen ihrer Explosivität in trockener Form nur schwer zu isolieren. Es bilden sich dabei unter anderem gefärbte Anhydride des Diazoniumsalzes. Dies ist möglicherweise neben der geringen Reagenzienstabilität eine Ursache für das überraschend breite Absorptionsmaximum der diazotierten Sulfanilsäure (siehe Abbildung 2c), die als Diazoniumsalz BM 31.612 vom Hersteller der Explosivität wegen nur in feuchter Form geliefert werden konnte.

Die Art der Substitution am Benzolring hat auch Einfluß auf die Meßwellenlänge (siehe Abbildung 2b-d). Bei para-Aminoderivaten, die mit einem zweiten Diazoniumsalz gekuppelt sind (z.B. Fast Garnet GBC) ist durch die konjugierte Doppelbindung im Molekül die Eigenfärbung für die photometrische Bestimmung zu stark. Dagegen zeigen para-Benzamidoderivate (z.B. Fast Violet B) günstige spektrale Eigenschaften, die auch die Messung bei einer Wellenlänge von 578 nm ermöglichen.

Die Temperaturabhängigkeit des Absorptionsverhaltens des bei der Kupplung von direktreagierendem Bilirubin mit Fast Red TR entstandenen Azofarbstoffes (siehe Abbildung 4b), wie sie in den vorliegenden Experimenten beschrieben wurde, bestätigt frühere Beobachtungen von Doumas et al. (8). Diesen Autoren zufolge ist die Temperaturabhängigkeit auf einen durch unzureichende Diazoniumsalzkonzentration unvollständigen Ablauf der Kupplungsreaktion zurückzuführen.

Diese Annahme (8) wird weiter durch die Beobachtung bestätigt, daß mit steigender Diazoniumsalzkonzentration im Ansatz das Reaktionsgleichgewicht nach rechts verschoben wurde und die Höhe des Meßsignals zunahm (siehe Abbildung 6).

Eine deutliche Zunahme des Meßsignals durch Detergenzienzusatz zum Diazoniumreagenz wurde nur bei der Reaktion des gesamten Bilirubins mit Fast Red TR bei pH 7 unter Zusatz von 10 % DMSO gefunden (siehe Abbildung 7c); hierbei wurde wahrscheinlich durch den Reaktionsvermittler noch restliches albumingebundenes Bilirubin für die Diazotierung verfügbar gemacht, wie es von Hoffmann und Weiss (17) 1983 auch nach Zusatz von DMF bei der Reaktion von Bilirubin mit Fast Red TR bei pH 5.2 beobachtet wurde.

Bei der Methode zur Bestimmung von Gesamtbilirubin nach Jendrassik und Grof (21) bewirkte der Zusatz von Coffein-Natriumacetat-Natriumbenzoat-Lösung unter anderem eine Anhebung des pH-Wertes. Nach der oben beschriebenen pH-Abhängigkeit der Azokupplungsreaktion nimmt bei Erhöhung des pH-Wertes die Reaktivität des Diazoniumsalzes gegenüber Bilirubin zu, so daß dann neben dem direkt reagierenden Bilirubin auch noch das hydrophobere α -Bilirubin erfaßt wird.

Dieser vorrangige Einfluß der pH-Wertänderung wiederum erklärt auch die Beobachtung, daß der Zusatz von Coffein zum Fast Red TR-Reagenz pH 5.2 bei Konstanthaltung des pH-Wertes keine Zunahme des Meßsignals bewirkte (siehe Abbildung 7b).

Aus der mit steigendem Serum- bzw. Albumineinsatz abnehmenden Extinktionsänderung (siehe Abbildung 9, 10a,b) läßt sich schließen, daß Diazoniumkationen aus dem Reagenz durch das in der Probe vorhandene Albumin weggefangen werden. Dafür spricht auch die nach der Reaktion von Fast Red TR mit Albumin beobachtete Extinktionszunahme bei 334 nm (siehe Abbildung 11). Die Diazoniumsalze interferieren so möglicherweise auch über Azokupplungsreaktionen mit den Histidyl-, Lysil- und Tyrosil-Resten der aromatischen Aminosäuren im

Albuminmolekül.

Die im Reaktionsansatz mit Albumin durch mechanische Manipulationen hervorgerufenen Extinktionsänderungen bei längerwelligem Licht (siehe Abbildung 12) ließen sich demnach durch eine Aggregation der diazotierten Albuminmoleküle zu größeren Partikeln erklären. Die hierbei nach mehrminütiger Inkubation beobachtete Abnahme des Meßsignals wäre dann auf ein Absinken der Partikel (siehe Abbildung 13) zurückzuführen.

Diese Beobachtungen bestätigen den von Gundlach und Mühlhausen (14) 1980 beschriebenen Einfluß von Fast Red TR auf Serumproteine. Dabei wurde bei der Kupplung von 1-Naphthol mit Fast Red TR in Gegenwart von Albumin eine deutliche Extinktionsabnahme beobachtet, die in vielen Fällen von der durch die Kupplung von Fast Red TR mit Albumin hervorgerufenen Extinktionszunahme wieder ausgeglichen wurde. Diese durch Albumin bedingte Extinktionszunahme verringerte sich ebenfalls mit zunehmender Inkubationszeit.

Die auch in der vorliegenden Arbeit beobachtete Störung der Bilirubinbestimmung durch Hämoglobin (siehe Abbildung 14) wurde bereits 1939 von Engel (10) mit der Zerstörung des Bilirubins durch die oxidative Wirkung des Oxyhämoglobins erklärt. Er empfahl deshalb, das im Serum vorhandene Hämoglobin in CO-Hämoglobin zu überführen.

Shull et al. (39) begründeten 1980 die unter Hämoglobin-Zusatz beobachtete Abnahme des Meßsignals bei der Methode nach Malloy und Evelyn (27) ebenfalls mit der Oxidation von Bilirubin. Bei der Methode nach Jendrasik und Grof (21) fanden die gleichen Autoren (40) jedoch eine Zerstörung der entstandenen Azobilirubinverbindung durch gebildetes Methämoglobin.

Homsher et al. (18) beschrieben 1979 den Einfluß des Hämoglobins sowohl durch Oxidation des Serumbilirubins

als auch durch Bildung von falsch hohen Probenleerwerten. Letzteres wurde auch von Shull et al. (40) und von Michaelsson et al. (29) als Ursache der Störung durch Hämoglobin diskutiert.

Novros et al. (32) hingegen führten diese Störung auf Interferenzen des Hämoglobins bei der Entstehung des Diazobilirubinkomplexes zurück, da sie bei Zugabe von Hämoglobin nach Ablauf der Diazotierungsreaktion keinerlei Einfluß feststellen konnten.

Michaelsson (28) hingegen beobachtete ebenso wie Homsher et al. (19) eine Zerstörung der Azobilirubinverbindung durch zugesetztes Hämoglobin.

Dies wurde 1983 von Van der Woerd-de Lange et al. (43) in unterschiedlichem Ausmaß ebenfalls bei 7 verschiedenen Verfahren zur Bestimmung von Serumbilirubin beschrieben. Dabei werden von den Autoren zwei Mechanismen zur Zerstörung des entstandenen Azofarbstoffes angegeben: sowohl das aus Oxyhämoglobin gebildete H_2O_2 als auch die peroxidative Wirkung des Hämoglobins zerstören dabei offensichtlich den Diazobilirubin-komplex.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiter geprüft, inwieweit die untersuchten Diazoniumsalze, insbesondere Fast Red TR, für die Bestimmung sowohl des gesamten als auch des direktreagierenden Bilirubins im Serum geeignet sind.

Für die Reaktion des direktreagierenden Bilirubins mit Fast Red TR errechnete sich aus den mit der in 2.2.4 beschriebenen Testversion erhaltenen Meßwerten ein molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{app} von $27.5 \times 10^3 \times l \times l/mol \times l/cm$. Er ist damit etwa halb so groß wie die von Richterich und Colombo (35) für die klassischen Verfahren zur Bilirubinbestimmung angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten.

Bei Verwendung des so ermittelten E_{app} fand sich für die Handmethode mit Fast Red TR eine mäßige Übereinstimmung der Meßwerte mit den Ergebnissen des Bilistrat^R-Tests. Die mittlere Gesamtabweichung der Regressionsgeraden $y = -0.08 + 1.09 x$ von der Winkelhalbierenden von 9 ° ist auf die relativ große Abweichung einzelner Meßwerte zurückzuführen (siehe Abbildung 16).

Für die Modifikation dieses Tests als Endpunktmethode mit Reagenzienstart fand sich dagegen eine gute Übereinstimmung mit dem Bilistrat^R-Test ($y = 0.153 + 1.022 x$) (siehe Abbildung 18). Der Reagenzienleerwert war bei beiden Testversionen vernachlässigbar klein.

Die hier beobachtete Linearität des Tests mit Fast Red TR bis mindestens 16.1 mg/dl direktreagierendes Bilirubin (siehe Abbildung 17) ist dem Linearitätsbereich herkömmlicher Methoden, z.B. am aca^R-Analysator, durchaus vergleichbar.

Bei der Adaptierung dieser Methode auf verschiedene Analysenautomaten fand sich am Zentrifugalanalysator Centrifichem^R eine nahezu völlige Übereinstimmung mit den Meßwerten des Bilistrat^R-Tests (siehe Abbildung 19). Am RA 1000^R dagegen zeigte sich eine gute Übereinstimmung beider Tests bis etwa 14 mg/dl direktes Bilirubin. Bei höheren Bilirubinkonzentrationen wichen die Meßwerte am RA 1000^R nach oben ab (siehe Abbildung 20).

Für die auf den Batchanalysator ACP 5040^R adaptierte Methode zeigte sich sowohl bei der Endpunktbestimmung (siehe Abbildung 21) als auch bei der kinetischen Version (siehe Abbildung 22) eine annähernde Übereinstimmung mit den Meßwerten des aca^R-Analysators. Der bei dieser Endpunktversion aufgetretene relativ hohe Reagenzienleerwert von 0.6 mg/dl ± 0.1 ist wohl als gerätebedingt anzusehen. Bei der Prüfung der Präzision

sion in Serie für die auf den Centrifichem^R adaptierte Methode lag der errechnete Variationskoeffizient VK von 7 % bei einem Mittelwert von 1.25 mg/dl gerade noch in dem für klinisch chemische Untersuchungen tolerablen Bereich.

Der für die Bestimmung des gesamten Bilirubins mit Fast Red TR ermittelte molare Extinktionskoeffizient ϵ_{app} betrug $28.4 \times 10^3 \times 1 \times 1/\text{mol} \times 1/\text{cm}$ und kam damit demjenigen für direktreagierendes Bilirubin relativ nahe.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Handmethode mit denen des Bilistrat^R-Tests fand sich im Bereich bis 10 mg/dl gesamtes Bilirubin eine sehr gute Übereinstimmung, bei höheren Werten war jedoch eine Abweichung von 6.7 % von der Winkelhalbierenden im Sinne zu hoher Meßwerte zu verzeichnen (siehe Abbildung 24). Eine ebenfalls gute Übereinstimmung mit dem Bilistrat^R-Test wurde mit der modifizierten Handmethode mit Reagenzienstart erzielt (siehe Abbildung 26).

Auch bei der hier vorgestellten Methode zur Bestimmung des gesamten Bilirubins mit Fast Red TR liegt die beobachtete Linearität des Tests bis mindestens 23.5 mg/dl gesamtes Bilirubin in einer vergleichbaren Größenordnung mit den herkömmlichen Methoden wie z.B. nach Jendrassik und Grof (21) oder am aca^R-Analysator (siehe Abbildung 25).

Bei der auf den ACP 5040^R adaptierten Methode zeigte sich für die kinetische Version eine nahezu völlige Übereinstimmung der Meßwerte mit den Ergebnissen der DPD^R-Methode (siehe Abbildung 29); im Vergleich dazu fand sich auch bei der auf dieses Gerät adaptierten Endpunktmethode eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen des Bilirubina frazionata^R-Tests. Bei Berücksichtigung des beobachteten Reagenzienleerwertes

von 0.2 mg/dl ± 0.1 zeigen auch die Meßwerte des RA 1000^R eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Bilistrat^R-Tests. Der Reagenzienleerwert ist bei dieser Testversion möglicherweise durch einen raschen Reagenzienverfall bei 37°C und pH 7.0 bedingt.

Für die Präzision in Serie ergab sich bei der kinetischen Bestimmung am ACP 5040^R ein Variationskoeffizient VK von 1.0 % bei einem Mittelwert von 13.75 mg/dl gesamtem Bilirubin. Er liegt damit durchaus vergleichbar mit den Variationskoeffizienten anderer Methoden wie z.B. nach Van den Bergh (42) am aca^R-Analysator.

Die Überprüfung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Fast Red TR-Teste durch Bilirubinbestimmung in Gallenflüssigkeit zeigte, daß das Bilirubin mit dem Diazoniumsalz Fast Red TR ebensogut erfaßt wird wie mit p-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat bei der Bestimmung am aca^R-Analysator.

Die Untersuchungen zur Bestimmung des gesamten Bilirubins mit Fast Violet B ergaben im Vergleich zu Fast Red TR einen wesentlich geringeren molaren Extinktionskoeffizienten E_{app} von $11.5 \times 10^3 \times 1 \times 1/\text{mol} \times 1/\text{cm}$ und nur im Bereich bis 10 mg/dl Gesamtbilirubin eine annähernde Übereinstimmung der Meßwerte mit denen des aca^R-Analysators. Bei der auf den RA 1000^R adaptierten Methode waren selbst bei Berücksichtigung des relativ hohen Reagenzienleerwertes von 0.6 mg/dl ± 0.3 im Bereich niedriger Bilirubinkonzentrationen deutlich erhöhte Werte gegenüber der DPD^R-Methode zu verzeichnen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß es durchaus möglich ist, direktes Bilirubin mit

stabilen Diazoniumsalzen selektiv zu erfassen, wenn die Reaktivität des Diazoniumkations und der pH-Wert der Reaktionslösung aufeinander abgestimmt sind. Für Messungen im pH-Bereich zwischen 5 und 7 ist es notwendig, durch Einführung "elektronenschiebender" Substituenten (Methyl-, Ethyl-, Phenylgruppen u.v.a.) die Elektronendichte am Diazoniumkation soweit heraufzusetzen, daß die Mitreaktion von indirektem Bilirubin auf ein Minimum reduziert wird.

Für die Bestimmung des gesamten Bilirubins ist es sodann erforderlich, den pH-Wert der Reagenzlösung in Richtung höherer Werte zu verschieben.

Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Testversionen mit Fast Red TR erwies sich die Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart als am besten geeignet zur Bestimmung sowohl des direkt reagierenden als auch des gesamten Bilirubins.

Theoretisch kann man sich eine Vielzahl von Diazoniumsalzen mit unterschiedlichen Substituenten vorstellen, die für die Bestimmung von Bilirubin geeignet sind. Mit Ausnahme von Fast Red TR genügen die hier getesteten Verbindungen hinsichtlich Löslichkeit, Höhe des Meßsignals, Vermeidung störender Begleitreaktionen (z.B. Azokupplung mit Serumalbumin) usw. noch nicht den heutigen Anforderungen der Klinischen Chemie.

Daß es lohnend wäre, an der Synthese eines Diazoniumsalzes, das alle diese Bedingungen in optimaler Weise erfüllt, zu arbeiten, beweisen die Studien von Watson (45) und Zieve et al. (48), in denen gezeigt wird, daß sich tatsächlich verschiedene Patientengruppen hinsichtlich des Anteils des direkten Bilirubins am Gesamtbilirubin unterscheiden. In einer neueren Arbeit zeigen Müller-Lissner et al. (31), daß eine exakte und

differenzierte Quantifizierung von Bilirubin auch heute noch in der klinisch-chemischen Diagnostik sinnvoll ist.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, unter welchen allgemeinen Bedingungen Bilirubin mit stabilen Diazoniumsalzen reagiert und in wie weit sich diese Reaktion für die Bestimmung von direkt reagierendem und gesamtem Bilirubin im Serum nützen läßt.

Die Bilirubinbestimmungen wurden mit kommerziell erhältlichen Testpackungen nach den von Jendrassik und Grof, von Van den Bergh und von Wahlefeld et al. beschriebenen Verfahren bzw. nach der eigenen Testversion durchgeführt.

An Diazoniumsalzen wurden hierzu Fast Red TR, Fast Red RC, Fast Violet B und Fast Garnet GBC (Sigma St. Louis) sowie die Salze BM 31.094, BM 31.612, BM 31.613, BM 31.614 und BM 31.615 (Boehringer Mannheim) verwendet.

Bei der Untersuchung der spektralen Eigenschaften zeigten nur Fast Red RC, Fast Red TR, Fast Violet B, BM 31.094, BM 31.613 und BM 31.614 nach der Kupplung mit Serumbilirubin im Bereich von 500 - 600 nm höhere Extinktionswerte als vor der Reaktion.

Die Reaktivität und Stabilität der Diazoniumsalzlösungen war deutlich pH-abhängig, wobei die Salze Fast Violet B, Fast Red RC und Fast Red TR erst bei pH-Werten über 6.5 mit indirektem Bilirubin reagierten. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb vorwiegend Fast Red TR verwendet.

Die durch die Kupplung von Fast Red TR mit direktem Bilirubin bei pH 5.2 bedingte Extinctionsänderung bei 546 nm zeigte sich abhängig von der Inkubationstemperatur und der eingesetzten Diazoniumsalzkonzentration.

Von den getesteten Reaktionsvermittlern bewirkte nur der Zusatz von 10 % DMSO zur Fast Red TR-Lösung pH 7.0 eine Zunahme des Meßsignals.

Fast Red RC und Fast Red TR zeigten bei pH 7.0 sowohl in den Reagenzlösungen als auch in den entstandenen Diazobilirubinkomplexen deutliche Instabilität.

Die erarbeiteten Methoden zur Bilirubinbestimmung mit Fast Red TR wurden durch Hämolyse sowie durch auftretende Nebenreaktionen, z.B. Azokupplung mit Serumalbumin, gestört.

Der molare Extinktionskoeffizient E_{app} der mit Fast Red TR entstandenen Azobilirubinverbindungen betrug für direktes Bilirubin $27.5 \times 10^3 \times 1 \times 1/\text{mol} \times 1/\text{cm}$ bzw. $28.4 \times 10^3 \times 1 \times 1/\text{mol} \times 1/\text{cm}$ für das gesamte Bilirubin.

Bei der Endpunktbestimmung mit Probenleerwert ergab sich im Vergleich zur Methode nach Jendrassik und Grof für direktes Bilirubin ein Korrelationskoeffizient r von 0.9279 bei einer mittleren Gesamtabweichung der Regressionsgeraden von 9 % sowie für das gesamte Bilirubin ein Korrelationskoeffizient r von 0.9946 und eine mittlere Gesamtabweichung von 6.7 %.

Bei der Endpunktbestimmung mit Reagenzienstart fand sich im Vergleich zu herkömmlichen Methoden ein Korrelationskoeffizient r von 0.9887 mit einer mittleren Gesamtabweichung von 2.2 % für direktes Bilirubin bzw. von $r = 0.9877$ und 4 % mittlerer Gesamtabweichung für gesamtes Bilirubin.

Der Linearitätsbereich dieser Methoden erstreckte sich bis mindestens 16.1 mg/dl direktes bzw. 23.5 mg/dl gesamtes Bilirubin.

Bei der Prüfung der Präzision in Serie ergab sich ein Variationskoeffizient VK von 7 % bei einem Mittelwert von 1.25 mg/dl für die Bestimmung des direkten Bilirubins bzw. von 1 % bei einem Mittelwert von 13.75 mg/dl für die Gesamtbilirubinbestimmung.

Die auf verschiedene Analysenautomaten adaptierten Testversionen zur Bestimmung des direkten Bilirubins mit Fast Red TR zeigten am Centrifichem^R eine nahezu völlige, am RA 1000^R und am ACP 5040^R eine gute Übereinstimmung mit der Methode nach Jendrassik und Grof. Die automatisierten Verfahren zur Bestimmung des Gesamtbilirubins mit Fast Red TR zeigten sowohl am RA 1000^R als auch am ACP 5040^R ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit herkömmlichen Verfahren.

Vergleichsuntersuchungen mit Fast Violet ergaben einen niedrigeren molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{app} von $11.5 \times 10^3 \times 1 \times 1/\text{mol} \times 1/\text{cm}$ und zeigten nur im Bereich von 0 - 10 mg/dl Gesamtbilirubin eine annähernde Übereinstimmung mit der Methode nach Van den Bergh.

Die Beobachtungen bezüglich der spektralen Eigenschaften und der pH-Abhängigkeit von Reaktivität und Stabilität der untersuchten Diazoniumsalze finden ebenso wie die beschriebenen Einflüsse von Inkubationstemperatur, Reagenzkonzentration, Detergenzienzusatz und Störfaktoren ihre Erklärung und Bestätigung in der aufgeführten Literatur.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß es bei Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen durchaus möglich ist, mit stabilen Diazoniumsalzen selektiv direktes Bilirubin zu erfassen bzw. die Gesamtbilirubinkonzentration zu messen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Billing, B.H., Cole, P.G. & Lathe, G.H. (1957)
Biochem. J. 65:774
- 2 Blanckaert, N. & D'Argenio, G. (1982)
Gastroenterology 82:1222
- 3 Bowie, L.J., Dohnal, J.C. & Kirkpatrick, P.B.
(1982) Clin. Chem. 28:385
- 4 Chu, S.Y., Kaczmareck, A. & Turkington, V.E.
(1982) Clin. Biochem. 15:113
- 5 Colombo, J.P., Peheim, E., Kyburz, S. & Hoff-
mann, J.P. (1974) Chem. Rdsch. 27:23
- 6 Colombo, J.P., Peheim, E., Kyburz, S. & Hoff-
mann, J.P. (1974) Clin. Chim. Acta 51:217
- 7 Combes, B. & Schenker, S. in Schiff, L. (Ed.)
(1975) Diseases of the Liver. Lippinott Phila-
delphia
- 8 Doumas, B.T., Perry, B.W., Jendrzeczak, B. &
Katona, V. (1982) Clin. Chem 28:2305
- 9 Ehrlich, P. (1883) Centbl. Klin. Med. 4:721
- 10 Engel, M. (1939) Hoppe Seylers Z. Physiol.
Chem. 259:75
- 11 Fellows, F.C.I. & Hird, F.J.R (1982)
Arch. Biochem. Biophys. 216:93

- 12 Fieser, L.F. & Fieser, M. (Eds.) (1974)
Organische Chemie. Verlag Chemie Weinheim
- 13 Fleischner, G.J. & Arias, M. (1967)
Am. J. Med. 49:576
- 14 Gundlach, G. & Mühlhausen, B. (1980)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18:603
- 15 Hertz, H., Dybkaer, R. & Lauritzen, M. (1974)
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33:215
- 16 Hillmann, G. (1971) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 9:273
- 17 Hoffmann, G.E. & Weiss, L. (1983)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21:31
- 18 Homsher, R., Wesenberg, J.C., Baginski, E.S. & Zak, B. (1979) Microchemical J. 24:526
- 19 Homsher, R., Chu, J.W. & Zak, B. (1981)
Clin. Chem. 27: 1067
- 20 Jendrassik, L. & Cleghorn, R.A. (1936)
Biochem. Z. 289:1
- 21 Jendrassik, L. & Grof, P. (1938)
Biochem. Z. 297:81
- 22 Kühn, H.A. & Wernze, H. (Eds.) (1979)
Klinische Hepatologie. Thieme Stuttgart
- 23 Lauff, J.J., Kasper, M.E., Wu, W. & Ambrose, R.T. (1982) Clin. Chem. 28:629

- 24 Lauff, J.J., Kasper, M.E. & Ambrose, R.T.
 (1983) Clin. Chem. 29:800

- 25 Lester, R. (1983) New England J. Med. 309:183

- 26 Lo, D.H. & Wu, T.W (1983) Clin. Chem. 29:31

- 27 Malloy, H.T. & Evelyn, K.A. (1937)
 J. Biol. Chem. 119:481

- 28 Michaelsson, M. (1961) Scand. J. Clin. Lab.
 Invest. 13:Suppl. 56

- 29 Michaelsson, M., Nosslin, D. & Sjölin, S.
 (1965) Pediatrics 35:925

- 30 Morrison, R.T. & Boyd, R.N. (Eds.) (1974)
 Lehrbuch der Organischen Chemie. Verlag Chemie
 Weinheim

- 31 Müller-Lissner, S.A., Presch, A., König, A.,
 Sonnenberg, A. & Horn, K. (1984)
 Dtsch. Med. Wschr. 109:576

- 32 Novros, J.S., Koch, T.R. & Knoblock, E.C.
 (1979) Clin. Chem. 25:1891

- 33 Ostrow, J.D. & Boonyapist, S.T. (1978)
 Biochem. J. 173:263

- 34 Rand, R.N. & Di Pasqua, A. (1962)
 Clin. Chem. 8:570

- 35 Richterich, R. & Colombo, J.P. (Eds.) (1978)
 Klinische Chemie. S. Karger-Verlag Basel

- 36 Scharschmidt, B.F., Blanckaert, N., Farina, F.A., Kabra, P.M., Stafford, B.E. & Weisiger, R.A. (1982) Gut 23:643
- 37 Schmid, R. (1957) J. Biol. Chem. 229:881
- 38 Schwertlick, K. (Ed.) (1972) Organikum. VEB Verlag der Wissenschaften Berlin
- 39 Shull, B.C., Lees, H. & Li, P.K. (1980) Clin. Chem. 26:22
- 40 Shull, B.C., Lees, H. & Li, P.K. (1980) Clin. Chem. 26:26
- 41 Talafant, E. (1956) Nature 178:312
- 42 Van den Bergh, A.A.H. & Snapper, J. (1913) Dtsch. Arch. Klin. Med. 110:540
- 43 Van der Woerd-de Lange, J.A., Guder, W.G, Schleicher, E., Paetzke, J., Schleithoff, M. & Wieland, O.H. (1983) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21:437
- 44 Wahlefeld, A.W., Herz, G. & Bernt, E. (1972) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29:Suppl. 126
- 45 Watson, C.J. (1956) Ann. intern. Med. 45:351
- 46 Weiss, J.S., Gautam, A., Lauff, J.J., Sundberg, M.W., Jatlow, P., Boyer, J.L. & Seligson, D. (1983) New England J. Med. 309:147

- 47 Winsten, S. & Cehelyk, B. (1969)
 Clin. Chim. Acta 25:441
- 48 Zieve, L., Hill, E., Hanson, M., Falcone, A.B.
 & Watson, C.J. (1951)
 J. Lab. Clin. Med. 38:446

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1982 bis Mai 1984 am Institut für Klinische Chemie des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching angefertigt.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. L. Weiss für die Überlassung des Themas und die wohlwollende persönliche Förderung.

Gleichermaßen Dank gilt Herrn Dr. G.E. Hoffmann für die vielen wertvollen Anregungen und die engagierte Unterstützung.

Allen Angestellten des Instituts für Klinische Chemie danke ich für die jederzeit gewährte Hilfestellung.

8. Lebenslauf

Am 5. Dezember 1959 wurde ich als Tochter des Beamten Ludwig Hiefinger und seiner Ehefrau Theresia, geborene Straubinger, in Simbach am Inn geboren.

Von 1966 bis 1970 besuchte ich die Volksschule Julbach, danach den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig am Tassilo-Gymnasium in Simbach am Inn, wo ich am 27. Juni 1979 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Wintersemester 1979/80 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München, das ich am 8. November 1985 mit der Ärztlichen Prüfung abschloß.

Am 18. November 1985 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Von November 1985 bis Juni 1986 war ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin von Herrn Prof. Dr. L. Weiss am Institut für Klinische Chemie des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching tätig.

Seit Juli 1986 bin ich als Assistenzärztin am Institut für Klinische Chemie des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen bei Herrn Prof. Dr. W.G. Guder beschäftigt.

